

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické technologie

Studijní obor: **Farmacie**

AFM ve farmaceutické technologii 2
AFM in Pharmaceutical Technology 2

Diplomová práce

Autor: Ing. Tatiana Princová

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Pavel Doležal, CSc.

Hradec Králové, květen 2014

Děkuji akademickému pracovníkovi Mgr. Pavlovi Berkovi za odborné rady při formování diplomové práce, a vedoucímu diplomové práce doc. RNDr. Pavlovi Doležalovi, CSc. za odborný dohled.

Děkuji mé rodině, především manželovi Ing. Jiřímu Princovi, která mě po celou dobu studia podporovala a poskytla mi dobré rodinné zázemí.

„Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem a veškeré myšlenky, data a jejich zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpala, řádně cituji. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

.....

Ing. Tatiana Princová

ABSTRAKT

Teoretická část se zabývá tématy týkajícími se tvorby nanovláken a nanomembrán různými způsoby elektrostatického zvlákňování. Literární rešerše je zaměřena na "medikované nanovláknenné membrány", poskytuje tak nejnovější informace o nanomembránách s obsahem léčiv a ukazuje také perspektivu využití nanovláken v této oblasti.

Experimentální část se zabývá nalezením AFM parametrů potřebných pro charakterizaci vzorků šesti vybraných polymerních nanomembrán s obsahem naproxenu, kyseliny listové a diosminu. Byl zkoumán vzhled a tloušťka nanovláken. Nastavené parametry měření AFM umožnily sledovat rozptýlení léčiva v nekystalickém stavu uvnitř nanovláken, pravidelné vláknité krystalické tvary přilehlé k povrchu nanovláken i nanorozměrné slitky polymerů. Sejmuté skeny vzorků jsou uloženy a jsou k dispozici pro další analýzu.

Klíčová slova: elektrospining, nanovláknna, naproxen, AFM, medikovaná membrána

ABSTRACT

The theoretical part deals with topics related to the formation of nanofibers and nanomembranes by different ways of electrospinning. The literary search focused on "medicated nanofibrous membrane" gives recent information on nanomembranes containing drugs and also shows the perspective of the use of nanofibers in this area.

The experimental part deals with AFM parameters needed for characterisation of the samples of six selected polymer nanomembranes with the content of naproxen, folic acid and diosmin. The appearance and thickness of the nanofibers was examined. The set up parameters of the AFM measurements allowed to observe the distribution of the drug in non-crystalline state within the nanofibers, regular fibrous shapes of crystal-like nanofibers as well as distinguished nanoingots of the polymers. The captured scans are stored and available for further analysis.

Keywords: electrospinning, nanomembrane, naproxen, AFM, drug-loaded
nanofibers

1 OBSAH

1	OBSAH	6
2	ÚVOD	8
3	ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE	9
4	TEORETICKÁ ČÁST	10
4.1	Elektrospining - elektrostatické zvlákňování	10
4.1.1	Tvorba nanovláken pomocí elektrostatického zvlákňování	10
4.1.2	Metody elektrického zvlákňování	11
4.1.2.1	Rotující kolektor	12
4.1.2.2	Metoda dvou a více trysek	12
4.1.2.3	Kotoučový kolektor s hranou	12
4.1.2.4	Metoda rámového kolektoru	13
4.1.2.5	Metoda Nanospider	14
4.1.3	Polymery a taveniny nanovláken	14
4.2	Mikroskopie atomárních sil	15
4.3	Rešerše termínu „medicated nanofibrous membrane“	18
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
5.1	Použité vybavení a suroviny	27
5.2	Měření vzorků nanomembrán metodou AFM	27
5.2.1	Popis a použití přístroje „Nanosurf easyScan 2 Flex AFM“	27
6	VÝSLEDKY MĚŘENÍ S POZNÁMKAMI	30
6.1	AFM nanovláčenné membrány z PVA se sumatriptanem	30
6.1.1	Optický snímek skenované plochy	30
6.1.2	Membrána z PVA při rozměru skenu 10 x 10 μm	31
6.1.3	Membrána z PVA při rozměru skenu 5 x 5 μm	32
6.1.4	Membrána z PVA při rozměru skenu 10 x 10 μm po bočním posunu	32
6.1.5	Detaily slitků na membráně z PVA	33
6.2	AFM membrány z PAA s naproxenem	34
6.2.1	Membrána z PAA s naproxenem, jiný pohled	34

6.3	AFM membrány PCL s naproxenem	35
6.4	AFM membrány z HPC, PEO a PVA s diosminem.....	38
6.5	AFM membrány z PVA s kyselinou listovou.....	39
6.6	Membrána z PVA s naproxenem v různých režimech AFM.....	40
6.7	Nanomembrána z PVA síťovaná kyselinou trihydrogenfosforečnou v programu Gwyddion.....	41
7	ZÁVĚRY	42
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	43
9	POUŽITÁ LITERATURA.....	45
10	PŘÍLOHY	50
10.1	Příloha číslo 1-Membrána z PCL a naproxenu	50
10.2	Příloha číslo 2-Membrána z PCL a naproxenu	51
10.3	Příloha číslo 3-Membrána z PAA a naproxenu	52
10.4	Příloha číslo 4-Membrána z PVA a SUM	53
10.5	Příloha číslo 5-Membrána z PVA a naproxenu	54
10.6	Příloha číslo 6-Membrána z PVA, PEO, HPC a diosminu.....	55

2 ÚVOD

Metody nazývané souhrnně mikroskopie rastrovací sondou zahrnují sledování a analýzu povrchů. Sonda mikroskopu, která se pohybuje nad vzorkem, může zaznamenávat nejen topografii, ale také různé fyzikálně chemické vlastnosti. Tunelová mikroskopie, známá již od roku 1928, využívá tunelový proud. Mikroskopie atomárních sil (AFM) využívá van der Waalsovy síly a slouží k trojrozměrnému zobrazování povrchů ^[1]. Při AFM proměřování vlastností nanovláknenných membrán je nutné brát v úvahu, že sledování atomární struktury vzorku je možné jenom tehdy, pracujeme-li na atomárně plochem povrchu, jehož zvlnění není větší než několik vrstev atomů.

Technika AFM se využívá při sledování vzorků, u kterých chceme zjistit různé rozložení odlišných sloučenin, našla uplatnění ve fyzice povrchů (první významnou aplikací byla rekonstrukce povrchu křemíku), později i v biologii (studium na živých buňkách) i v technologii testování integrovaných obvodů, nebo např. při kontrole kvality vyrobených CD.

V oblasti farmaceutické technologie je v současné době využití metod AFM vlastně teprve v počátcích. Předkládaná práce je zaměřena na oblast medikovaných nanovláken, která je v průmyslovém měřítku také ještě na začátku svých možností.

Nanovlákná zkoumaná v předkládané diplomové práci leží v submikrometrické oblasti a pohybují se řádově ve stovkách nanometrů. Byla připravena v laboratořích firmy Elmarco Liberec, s.r.o, metodou zvanou elektrostatické zvlákňování, elektrospining (anglicky electrospinnig) ^[2]. Jejich proměření pomocí AFM je součástí vstupních prací, na které budou navázána další hodnocení nanovláknenných membrán, včetně jiných přístupů ke zpracování naskenovaných dat.

3 ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

1. Podat přehled informací o elektrospiningu a mikroskopii atomárních sil (AFM).
2. Zpracovat rešerši termínu “medicated nanofibrous membrane“ na portálu www.sciencedirect.com ke dni 14.10.2013.
3. Vlastní posouzení nasnímaných AFM skenů průběžně zaměřit pouze na výskyt léčivých látek a artefaktů, případně jejich vyznačení, v jasných případech na vyloučení nezdařilých snímků, budou-li to z technického a metodického přístupu k praktickému provedení opodstatněné.
4. Pro další technicko-metodické hodnocení vybraných nanovláknenných membrán nasnímané zdařilé AFM skeny vzorků nanomembrán popsat a uložit tak, aby mohly být dále zpracovávány podle dalších potřeb komplexního hodnocení vlastností vláken.
5. Závěrem orientačně vyzkoušet způsob načtení skenu do zobrazovacího a vyhodnocovacího programu Gwyddion a komunikaci s tímto programem.

4 TEORETICKÁ ČÁST

4.1 Elektrospining - elektrostatické zvlákňování

4.1.1 Tvorba nanovláken pomocí elektrostatického zvlákňování

Elektrostatické zvlákňování (EZ) v současnosti představuje vysoce univerzální a v principu poměrně jednoduchou metodu zpracování polymerů nebo tavenin za účelem vytvoření jemných, možno říci nekonečných, vláken v průměru od mikrometrů až po jednotky nanometrů. Tento způsob zpracování vznikl ve druhé polovině 20. století a v současnosti je využíván několika firmami také v ČR. Vzniklá vlákna, a z nich vytvořené nanovláknenné membrány, se využívají v celé řadě odvětví, např. v textilním průmyslu, ve filtračních zařízeních a v optoelektronice ^[3]. V medicíně je snaha využít tyto membrány při léčení ran, při terapii nádorů a také jako nosiče a stavební jednotky v tkáňovém inženýrství ^[4, 5, 6, 7].

Podstata metody spočívá ve tvorbě vlákna pomocí elektrostatického pole, které je vytvořeno vysokým napětím 100 až 500 kV.

Zařízení pro EZ se skládá z několika částí:

- Zdroj napětí
- Donorová elektroda
- Kolektor vytvořených vláken s elektrodou a uzemněním

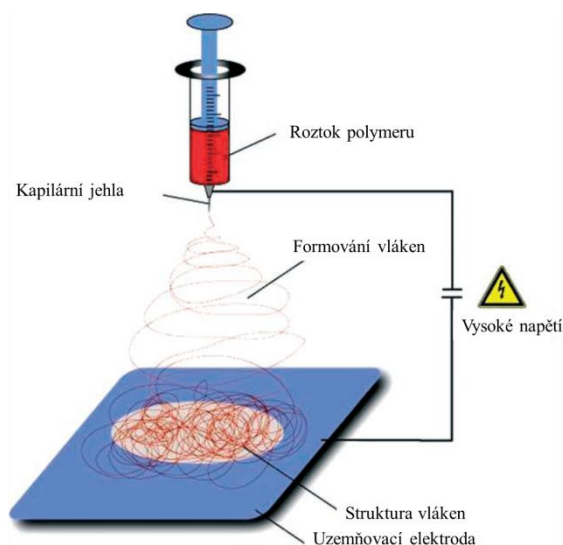
Elektrospining

Injektor s kapilární trubicí (injekční stříkačka, pístové čerpadlo apod.) obsahuje roztok nebo taveninu polymeru a tato kapalná soustava je přes kapiláru protlačována ven. Díky povrchovému napětí se kapalina na konci kapiláry drží v podobě kapky. Elektrické pole působí na polymer, kapička se prodlužuje a vzniká tzv. Taylorův kužel.

Po překonání sil povrchového napětí se kužel prodlužuje do podoby velmi dlouhého a tenkého vlákna, které je zachyceno na kolektoru. Rozpouštědlo, které je obsaženo v roztoku s polymerem, se při tomto procesu odpaří. Na kolektoru zůstane čisté vlákno polymeru s téměř nulovou koncentrací rozpouštědla.

Vzhledem k tomu, že elektrický náboj na kolektorové elektrodě je rovnoměrný, jsou i vzniklá vlákna na kolektoru nahodile, avšak rovnoměrně rozložena. Nerovnoměrný je pouze průměr vláken. Ten závisí na několika faktorech, jako např.

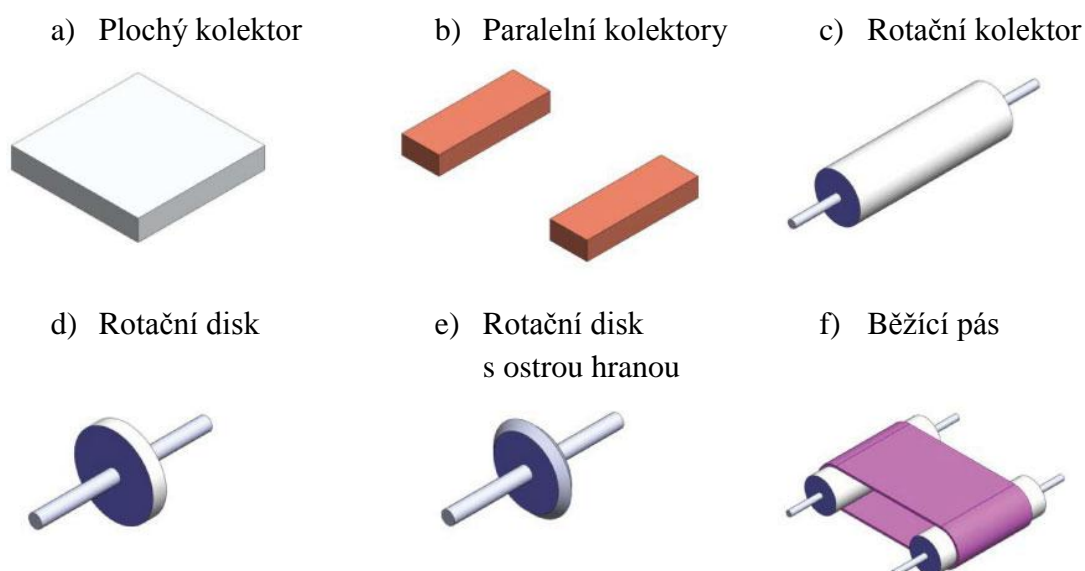
rychlost průtoku kapalně soustavy kapilárou, koncentrace polymeru a těkavost rozpouštědla.



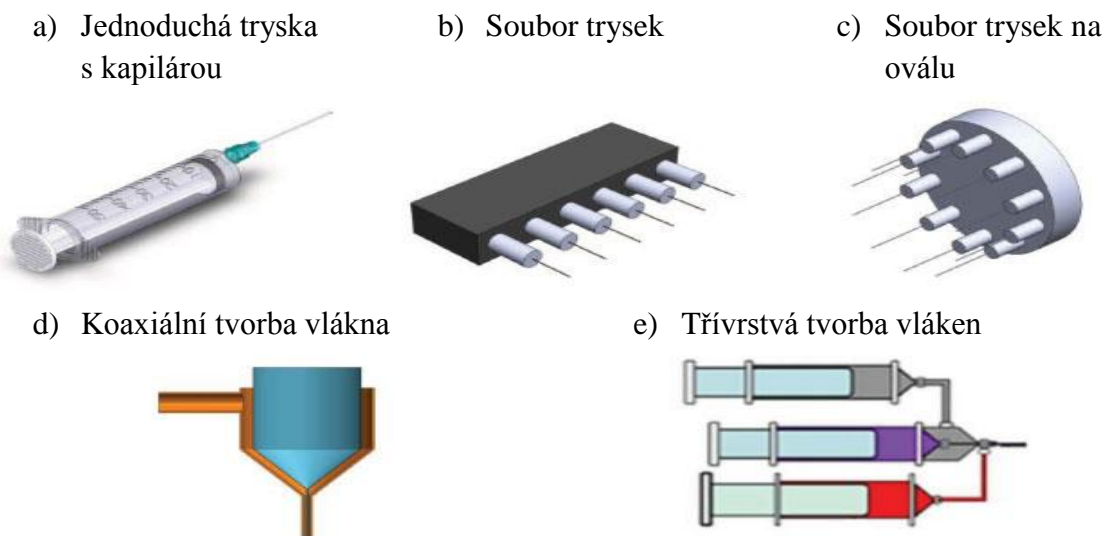
Obr. 1: Tvorba nanovlákná elektrospiningovou metodou s použitím vysokého napětí dvou elektrod, trysky s kapilárou a zachytávací podložkou pro nanovlákná ^[2]

4.1.2 Metody elektrického zvlákňování

Metody se rozdělují podle typu kolektoru (Obr. 2), nebo podle typu donorové elektrody, která vytváří vlákna (Obr. 3).



Obr. 2: Typy kolektorů ^[2]



Obr. 3: Jednotlivé druhy trysek ^[8]

4.1.2.1 Rotující kolektor

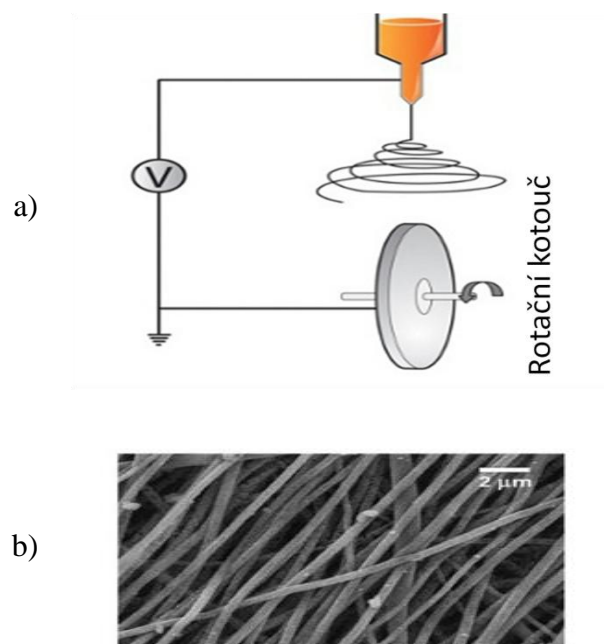
Polymer nebo tavenina vychází z trysky a kapiláry, vytvořené vlákno je namotáváno na rotující válec, který má podobu teflonové trubice. První elektroda se nachází v roztoku přímo v trysce a druhá se v podobě mřížky nachází pod rotujícím kolektorem.

4.1.2.2 Metoda dvou a více trysek

Místo jedné trysky se používá trysek více. Jedna například produkuje polymer a další obaluje jádro vytvořené z polymeru léčivou látkou (metoda „core-shell“), Obr. 3d, Obr. 3e.

4.1.2.3 Kotoučový kolektor s hranou

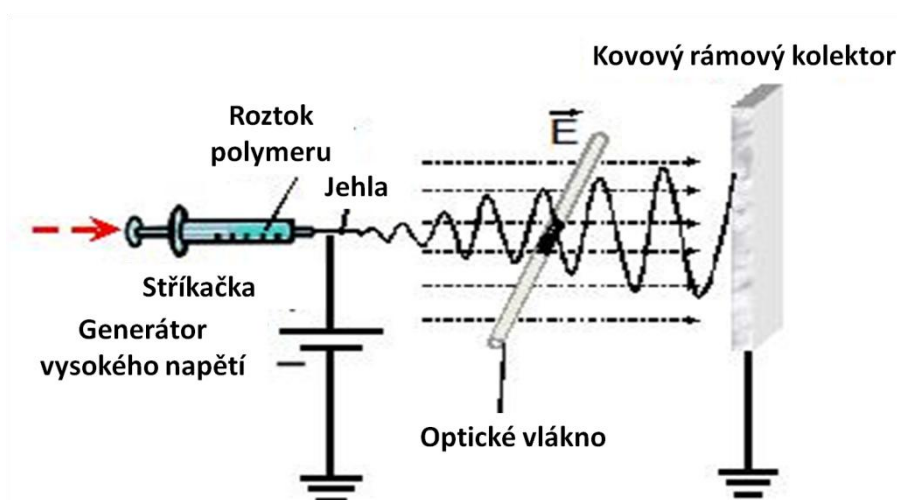
Kotouč jako druhá elektroda přitahuje na svou ostrou hranu vytvořené vlákno. Vlákno se namotává postupně na cívku a vytvořené vrstvy jsou vzájemně odpuzovány zbytkovým elektrostatickým nábojem a díky tomu neslepují se (viz Obr. 4). Průměr kotoučové elektrody se může lišit.



Obr. 4: a) Tvorba vláken na rotačním disku (druh kolektoru); b) Mikroskopický snímek rovnoměrného namotávání vláken na rotační disk ^[8]

4.1.2.4 Metoda rámového kolektoru

Tato metoda spočívá v postupném ukládání vytvořených vláken na kovový rámový kolektor, zhotovený většinou z hliníku. Kolektor může být statický nebo rotující. Uspořádání vláken je rovnoměrné.

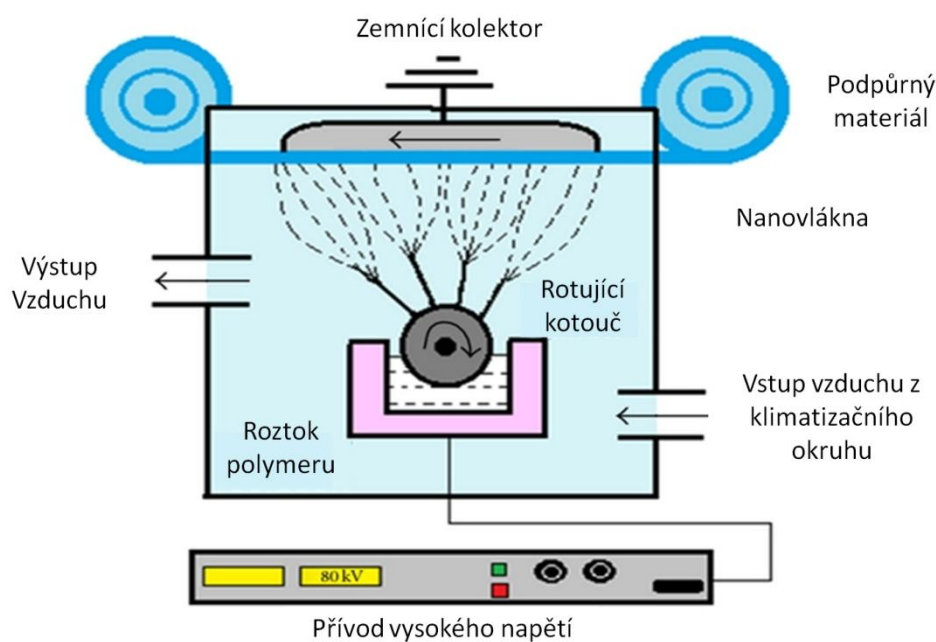


Obr. 5: Metoda rámového kolektoru - tvorba nanovláken jednoduchou tryskou; vlákna jsou zachytávána na rámovém kolektoru z hliníku ^[9]

4.1.2.5 Metoda Nanospider

Metoda, ve které se nepoužívají trysky, je produktem firmy Elmarco^[9]. Místo trysek se používá rotující elektroda částečně ponořená do polymeru – jedná se o mokré zvlákňování (MZ) – „wet electrospinning“.

Pomocí elektrostatického pole se na válci vytvoří množství Taylorových kuželů, ze kterých vznikají tenká vlákna, která se ukládají na kolektor (rotující, statický).



Obr. 6: Tvorba vláken nanospiderovou metodou, která nepoužívá trysku, ale rotující elektrodu v polymeru; vlákna jsou zachytávána na běžícím pásu^[2]

4.1.3 Polymery a taveniny nanovláken

Pro výrobu nanovláken se nejčastěji používají polymerní látky. Zvlákňovat lze ovšem také anorganické materiály. Z polymerů se jedná především o následující^[10, 11]:

- Biopolymery: kolagen, nebo kolagen s oxidem polyetylenem (PEO).
- Hydrofilní polymery, nebo polymery jako PEO, kyselina polyvinyllová (PVA), kyselina polyakrylová (PAA), hydroxypropylcelulóza (HPC).
- Biodegradovatelné polymery: kyselina polymléčná (PLA), kyselina polyglykolová (PGA), polyesteruretan (PEU).
- Organické polymery: polybenzimidazol, polykarbonáty, polyamidy, polyimidy, polyvinylchlorid (PVC), polyvinylbutyral (PVB).

- e) Taveniny: polyethylen (PE), polypropylen (PP), polyamid 12 (PA12), polyuretan (PUR).
- f) Různé organické sloučeniny: polyethylenafthalát (PEN), polyfenylvinyl (PPV).

4.2 Mikroskopie atomárních sil

Mikroskopie rastrovací sondou, SPM, (anglicky Scanning Probe Microscopy), využívá skenovací sondy k měření a sledování určitých částic ^[3,12].

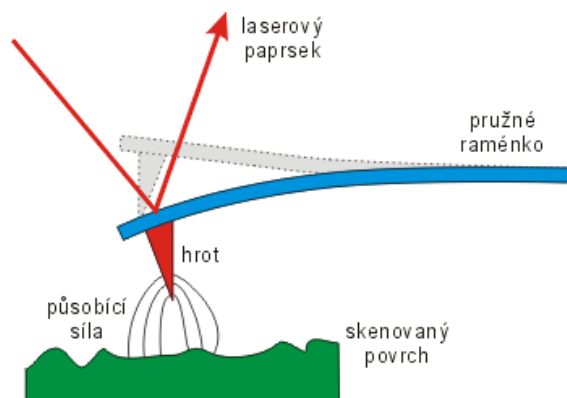
Studovanými materiály jsou například:

- Částice nanoprášků, kvantové tečky, nanovlákná.
- Kompozitní materiály obsahující nanočástice.
- Materiály s uhlíkovými nanotrubicemi.
- Tenké vrstvy, nanovrstvy, nanopovlaky.
- Kovy a slitiny.
- Nanokeramika.
- Polymerní nanokompozity, polymerní nanomateriály.
- Medikované soustavy pro biomedicínu.

Metody SPM můžeme rozdělit na skenovací tunelovou mikroskopii, (STM), a mikroskopii atomárních sil, AFM, (anglicky Atomic Force Microscopy).

Podstata STM spočívá v tom, že mezi povrchem vzorku a hrotem skenovacího raménka se vytváří tunelový proud (viz Obr. 7), který závisí na topografii vzorku a lokálních povrchových elektrických vlastnostech vzorku. Důležité je, aby povrch vzorku byl vodivý a došlo ke vzniku tunelového proudu.

Metoda AFM není omezena na vodivé materiály jako mikroskop pro STM, protože pracuje pouze s meziatomovými van der Waalsovými silami.



Obr. 7: Obrázek ukazuje skenovací raménko (cantilever) a zkoumaný vzorek ^[4]

AFM mikroskopie postupně, bod po bodu zobrazuje vzorek. Používá se k trojrozměrnému zobrazování povrchů. Tato metoda dosahuje velmi vysokého rozlišení (sestupně až do velikosti nanometrů). Technika AFM mikroskopie se dá použít k zobrazování, k tvorbě struktur nebo zpracování povrchů (nanolitografie). Vzájemná meziatomová přitažlivost slouží k detekci. Sleduje se závislost meziatomové van der Waalsovy síly raménka (tzv. cantileveru) od povrchu vzorku.

Kromě van der Waalsových sil zde také působí síla kapilární (v tenké vrstvě kapaliny vlivem povrchového napětí) a tíhová síla, která se vytváří přímo v ramínku vlivem jeho hmotnosti.

AFM může měřit ve třech režimech:

- Kontaktní
- Bezkontaktní
- Semikontaktní

Kontaktní režim

1. Hrot je mírně vtlačován do vzorku a následkem působení sil dochází k ohnutí raménka. Během měření se hrot pohybuje po povrchu a výška druhého konce raménka je konstantní. Podle nerovnosti povrchu vzorku má raménko různou velikost ohnutí, a tím sestavuje zvětšený obraz vzorku. V případě, že nerovnost vzorku je příliš velká, dojde k poškození hrotu.
2. Častěji se používá konstantní ohnutí a raménko se přibližuje nebo oddaluje. Pomocí tohoto režimu můžeme zobrazovat i drsnější vzorky, ale tento režim je pomalejší.
3. Kombinace výše zmíněných způsobů – rychlejší a umožňující měřit i vzorky s většími výškovými rozdíly bez poškození hrotu.

Bezkontaktní režim

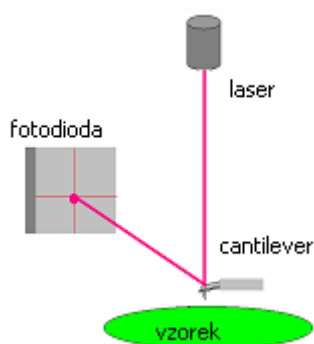
Raménko je rozkmitáváno působením přitažlivých sil a místo ohnutí se zde měří velikost amplitudy a fázový posun. Jelikož velikost amplitudy závisí na vzdálenosti mezi hrotem a vzorkem, lze sledováním změn amplitudy sestavit obraz povrchu vzorku. Výhodou tohoto režimu je, že se hrot neopotřebovává a zároveň nedochází ani ke kontaminaci vzorku. Důsledkem vlastností této metody je fázový kontrast snímků. Vlákna jsou vyobrazena světlejšími odstíny barev než mezery mezi nimi, kde hrot snímá vzdálenější struktury zkoumaného vzorku. To je použito v obrázcích v kap. 6.

Semikontaktní režim

Jedná se o takzvaný pokleповý režim (intermittent/tapping mode). Princip je podobný jako u nekontaktního režimu, amplituda kmitů je tak velká, že dochází k periodickému kontaktu se vzorkem. Působí zde přitažlivé i odpudivé síly.

Konstrukce AFM

Výsledky měření AFM jsou závislé na přesnosti udržování polohy hrotu, jeho pohybu a schopnosti správně detekovat ohnutí raménka. Aby bylo možné udržet přesnou polohu hrotu, jsou mikroskopy umístěny na antivibračních stolech. Detekce ohnutí raménka se provádí pomocí laseru (Obr. 8).



Obr. 8: Laserové zachytávání povrchu vzorku ^[13]

Laserový svazek z diody dopadá na raménko, jeho odraz dopadá na fotodetektor. Při ohnutí raménka se mění i úhel dopadu laserového paprsku a odražený svazek dopadne na jiné místo fotodetektoru. Jedna část soustavy nesmí mít žádný stupeň volnosti (je fixovaná a nepohybuje se). Ve většině případů se jedná o soustavu s fixovaným vzorkem, zobrazuje se pouze povrch vzorku. Druhou variantou je pevný hrot a pohybující se vzorek.

Pracovní prostředí

Na prostředí nejsou vyžadovány žádné zvláštní požadavky, mikroskop může pracovat v kapalině, ve vzduchu i při ultravakuu ^[3].

Snímací zařízení

Skenovací hlavice musí mít přesné nastavení, používají se výhradně piezoelektrické skenery. Mohou být také keramické nebo z PbZrTi (olovnatý zirkonium titanát). Výsledek skenování závisí na přesnosti snímacího zařízení.

Raménko, cantilever

Raménko a hlavně jeho hrot jsou vyráběny z křemíku, nitridu křemíku nebo z grafitu. Hrot by měl být ostřejší než nejmenší detail sledovaného vzorku, protože jinak se ve výsledcích objeví zkreslení chybou měření. Může mít tvar pyramidy, tetraedru, kuželu nebo kónického válce.

Kromě hlavního rozdělení AFM (kontaktní, bezkontaktní) existují i jiné druhy AFM mikroskopie, například:

- **LFM** (mikroskopie laterálních sil): sledování různé třecí síly při tahavém pohybu hrotu.
- **FMM** (mikroskopie modulovaných sil): měření elastických vlastností povrchu vzorku.
- **MFM** (mikroskopie magnetických sil): hrot raménka je pokryt feromagnetickou vrstvou a sleduje rozložení magnetických sil.
- **EFM** (mikroskopie elektrostatických sil) ^[2].
- **KFM** (potenciální (Kelvinova) mikroskopie): využívá detekci elektrostatického stavu povrchových struktur.
- **AAC (Acoustic AC Mode)**: využívá k detekci povrchu akustické vlny.
- **MAC (Magnetic AC Mode)**: využívá k detekci magnetické pole.

Nevýhody AFM:

- Omezený rozsah velikosti obrázku, pomalé snímání.
- Omezená výška vzorku.
- Možnost zachycení a znečištění hrotu, poškození vzorku.
- Nenulová šířka hrotu může vést k deformaci obrazu.

4.3 Rešerše termínu „medicated nanofibrous membrane“

Na portálu www.sciencedirect.com bylo ke dni 14.10.2013 nalezeno 44 záznamů, které jednotlivě popisují různé způsoby tvorby nanomembrán a jejich využití v medicíně, případně i v potravinářském průmyslu. Popisují také kombinace různých léčiv a vliv zvláknění na rychlosti působení v organizmu.

Ve farmacii se čím dál více využívá podávání léčiv ve formě mikročástic, nanoemulzí, mikroemulzí, tekutých lipidových nanočástic, nanovláken a nanomembrán.

Pro studium těchto částic se využívají různé druhy mikroskopie, které jsou popsány ve studii autorů Klang a kol. ^[14]. Vychází se z elektronové mikroskopie (EM), která pro měření využívá elektronů místo světelných paprsků, a zobrazuje objekty řádově menší než u světelných metod. Dalšími druhy mikroskopie mohou být například kryoelektronová mikroskopie (Cryo Electron Microscopy, CEM), která využívá pro sledování hydratované biologické vzorky v zamraženém stavu, transmisní elektronová mikroskopie (TEM) ukazuje mikrostrukturu materiálů, spektroskopie ztrátové energie elektronů (EELS) využívá k analýze energetickou distribuci elektronů, které prochází skrz vzorek, rastrovací elektronová mikroskopie (Scanning Electron Microscopy, SEM) je výhodná pro porézní materiály.

Ve studiích Liang a kol. ^[15] a Szentivanayi a kol. ^[5] se pojednává o biodegradovatelných nanovláknenných soustavách, maticích zvaných scaffoldy, vytvořených elektrostatickým zvlákňováním. Léčiva založená na těchto maticích se začínají aplikovat při regeneraci kostní tkáně a léčbě kostních tumorů. Pórovitý scaffold se integruje do mikroprostředí osteoblastů. ^[16] Výzkumy se zaměřují rovněž na přenos kmenových buněk za pomoci scaffoldů, které kost regenerují. Jako polymer se využívá např. polykaprolakton (PCL).

Matrice tohoto typu vytvořené EZ je možno použít rovněž i v mnoha jiných biomedicínských aplikacích. Klíčovou roli pro použití hraje výběr správného polymeru, vyhovující poměr smíchání přírodních a syntetických polymerů a správné zvlákňování, Kim a kol. ^[17].

Základem nanovláknenných matic bývá často PLA, poly L - kaprolakton (PLCL) a želatina. Výroba funkčních tkání pomocí scaffoldů vyžaduje hlavně mikrovláknna a nanovláknna. Složitá trojrozměrná geometrie scaffoldů umožňuje nahradit krevní cévu, chrupavku, část srdeční chlopně, alveolární kost nebo epiteliální tkáň.

Elektrostatické zvlákňování a elektrostatické sprejování představují jednoduché elektrohydrodynamické metody vytváření vláken nebo kapének umožňujících jednorázové podávání léčiv ^[18]. Podstatou elektrostatického sprejování je vytváření kapiček pomocí přerušovaného napětí. Využívá se například při podávání doxorubicinu nebo ampicilinu. Jednou z metod EZ je koaxiální zvlákňování. Jeho výhodou je, že umožňuje kombinovat hydrofobní léčivo s hydrofilní látkou, přičemž průřez vlákna může být od 100 nm do 300 μ m a výsledné vlákno je koaxiální (struktura „core-shell“).

Další studie Yu a kol. ^[19] zkoumá využití koaxiálního zvlákňování při výrobě ketoprofenu vmezeřeného do acetátcelulosových nanovláken. Acetát celulosy, který tvoří matici, je biodegradovatelný lineární polysacharid s vysokou biokompatibilitou. Ketoprofen je nesteroidní antiflogistikum. Průměr vláken závisí na repulzních silách a průměru trysky. Problém při formulaci představuje hlavně koncentrace polymeru. Malá koncentrace nezabezpečuje správné ukládání vláken na podložní fólii, spunbond, vysoká koncentrace může způsobit ucpání trysky. Použitím vhodného rozpouštědla je možné docílit průměr vláken cca 240 ± 30 nm. V konečné fázi se rozpouštědlo odpaří.

Pomocí emulzního zvlákňování vodného roztoku poly-L-mléčné kyseliny (PLLA) jsou získána netkaná vlákna s průměrem cca 350 nm. Pro zapouzdření byl vybrán hydrofilní protein cytochrom C. Nanovlákná mají hydrofobní povrch, což vede k pomalému uvolňování léčiva. Přidáním hydrofilního polymeru při EZ lze ovlivnit rychlost disoluce léčiva. Do PLLA je možné vmezeřit např. tetracyklinhydrochlorid, nesteroidní antiflogistikum ibuprofen, nebo rifampicin, Yu a kol. ^[19], Maretschek a kol. ^[20].

Tamoxifen je léčivo používané při léčbě prsního karcinomu, k léčení komplikací při menopauze nebo jako adjuvantní terapeutikum po resekci tumoru, Nie a kol. ^[21]. Podstata mokrého zvlákňování, které se využívá hlavně v textilním průmyslu, spočívá v rozpuštění tamoxifenu v roztoku, kde se nachází polymer (polyakrylonitril, PAN). Postupným protahováním vzniká vlákno o průměru 40 μ m. až 60 μ m. Mokré zvlákňování zajišťuje vlákna homogenního průměru s vysokou pevností v tahu.

Výzkum scaffoldů prováděný Dong a kol. postupoval od nanotrubíček až po 3D-scaffoldy s použitím suspenze oxidu titaničitého ve vodě ^[22]. Při teplotě 150 °C až 250 °C se podařilo vytvořit titanovou folii jako základ nanomembrány. Rozměry nanovláken závisely na teplotě, koncentraci a časové délce procesu. Nanovlákná a z nich vznikající nanomembrány jsou pórovité (průměr pórů je 0,5 μ m až 10 μ m) a je možno je použít jako biokompatibilní materiál, fotokatalyzátory, fotovoltaiické články, vysokoteplotní katalyzátory, senzory nebo nosiče léčiv ^[23].

Jiné nanomembrány byly připraveny z alginátu sodného a PEO elektrosvlákňováním z vodní disperze, Ma a kol. ^[6]. Jedná se opět o strukturu typu jádro – obal, a byly studovány metodami SEM, TEM nebo rentgenovou mikroskopií.

Za účelem zlepšení hydrofobních vlastností jsou nanomembrány ponořeny do roztoku chloridu vápenatého, Kim a kol. ^[17]. Tyto nanomembrány jsou pro lidské buňky netoxické, naopak podporují jejich proliferaci.

Poranění šlach je často komplikováno možností vzniku pooperačních infekcí způsobených hlavně G⁺ bakteriemi *Staphylococcus aureus* a G⁻ bakteriemi *Pseudomonas aeruginosa*, Liu a kol.^[24]. Bylo zjištěno, že použití PLLA membrány s nanočásticemi stříbra zabraňuje nežádoucím srůstům a snižuje adhezi výše uvedených bakterií na poraněná místa. Vytvořené 3D scaffoldy byly pozorovány pomocí SEM nebo TEM a bylo zjištěno snížené množství bakterií v ráně při použití této kombinace v porovnání s čistou PLLA membránou.

3D anizotropní polymery se využívají při rekonstrukci tkání pohybového aparátu, Ionescu a kol.^[25]. V podstatě mohou nahradit kolagen, který je nelineární a anizotropní, a to při reparaci kolenního menisku, šlach, vazů, cév i kloubní chrupavky. Scaffoldy z nanovláken lze využít při vzniku mikrosfér, které řídí tvorbu buněk bez změny mechanických vlastností polymerů. Mikrosféry léčiv jsou uchyceny mezi nanovlákná a vmezeřeny do jejich materiálu. Jako ideální se jeví rozměry 10 μm až 20 μm . Menší rozměry by mohly být vylučovány, mikrosféry větších rozměrů by mohly narušit mechanické vlastnosti scaffoldů. Uvolňování může probíhat až 4 týdny.

Uhličitan vápenatý může krystalizovat ve třech modifikacích - kalcit, aragonit a vaterit, Obata a kol.^[26]. Pro řízenou regeneraci kostí se využívají sítě z mikrovláken PLA, kde je vmezeřen silikon spolu s uhličitanem vápenatým (vybrána modifikace vaterit). PLA vytváří 3D scaffoldy, mikrovlákná jsou tvořena pomocí EZ. Pokusy in vivo na králících byla zjištěna zvýšená tvorba hydroxyapatitu, plynulé uvolňování křemíku a zvýšená proliferace osteoblastů.

Stříbro samo o sobě vykazuje protimikrobní aktivitu, Cancetti a kol.^[27]. Ve spojení s netkaným podkladem z PVA, PVA a borax, nebo na podkladě typu Gellan/Hyaff (speciální hydrofilní esterifikovaný polysacharid) se jeho aktivita ještě zvýšila, snížil se počet převazů ran a popálenin. Snížila se přilnavost na rány a bylo zajištěno vlhké prostředí pro hojení ran. V posledních letech byly uvedeny na trh různé typy obvazů se stříbrem, jako např. Acticoat, Aquacel-Ag, Ag-Actisorb, Silverlon. Právě stříbro v kombinaci s PVA – borax nebo Gellan/Hyaff poskytuje další vylepšení při hojení kůže.

Ve studii Jianga a kol. je popisováno uvolňování ketazonu nejprve z obalu polyvinylpyrolidonu (PVP), a následně z jádra ze zeinu (kukuřičný protein)^[28]. Nanovlákná o průměru 730 nm s obalem (šíře cca 90 μm) jsou lineární, homogenní. Léčiva v jádru a obalu jsou v amorfním stavu. Disoluční testy ukázaly, že ketazon

se uvolňuje plynule až 10 hodin. Podobně se uvolňují nejen NSAID, ale i antihypertenziva, antihistaminika a léky proti alergii.

V další studii Zu a kol. je popsána tvorba membrány ze zeinu, kde obal tvoří ketazon ^[29]. Membrána je vytvořena pomocí koaxiálního zvlákňování se dvěma tryskami při napětí 15 kV. Vlákná se ukládají na hliníkovou folii. Vlastnosti a rozložení ketazonu v obalu bylo sledováno pomocí SEM, TEM a DSC.

Ketazonu je využito také při tvorbě nanovláken s jádrem z hydrogelu želatiny a vnější vrstvy z PCL, Lu a kol. ^[30]. Do této membrány byl inkorporován heparin, který specificky interagoval se želatinou. Složení této koaxiální membrány v podobě 3D scaffoldu bylo podobné jako přirozená extracelulární matrice a je možné ji v budoucnosti využít ve tkáňovém inženýrství.

Studie Qi a kol. ^[7] zkoumala vlastnosti hydrochloridu tetracyklinu, dvojité zapouzdřeného v nanomembráně vytvořené pomocí EZ z aluminiumsilikátu a PLA. Toto složení zlepšilo pevnost v tahu, udržovalo stabilní strukturu scaffoldu a zlepšila se mechanická odolnost. Při zkoušení s buňkami myších fibroblastů se léčivo postupně uvolňovalo až 42 dnů. Vynikající cytokompatibilita a antibakteriální aktivita dává perspektivu ve využití v tkáňovém inženýrství a k překrývání a hojení ran.

Zkoumáno bylo také uvolňování dvou léčiv s rozdílnou lipofilitou, a to lidokainu a muciprocinu z PLLA scaffoldu, Thakur a kol. ^[31]. Zajímavé bylo, že lidokain se rychle uvolnil během první hodiny (80%) a 20% se uvolňovalo pozvolně po několik hodin, ATB v první hodině 5% a zbytek během následujících 72 hodin. Polymer jako 3D scaffold udržel antibiotickou aktivitu 3 dny.

Bylo zjištěno, že současná přítomnost těchto léčiv v uvedené nanomembráně změnila jejich kinetiku. Dvojité uvolňování léčiva (lidokain a ATB) se ukázalo velice efektivní. Při kombinaci etylenoxidu a ATB nebylo prokázáno prodloužené uvolňování léčiv. Studie ukázala, že v případě lipofilního polymeru a lipofilního léčiva je možné ovlivnit disoluci hydrofilní soli.

Ve studii Amina a kol. ^[32] byly použity scaffoldy založené na olivovém oleji, který obsahuje vitamin E, antioxidanty. Optimální koncentrace oleje je 5 %. Pokusy byly provedeny in vitro s bakteriemi *Escherichia coli*. Stříbro má antibakteriální aktivitu a spolu s polyuretanem a olivovým olejem se jeví jako ideální kombinace při podání na popáleniny, kožní infekce a obvazový materiál.

Polymerní nanovlákná s léčivy se využívají k hojení ran, Said a kol. ^[33], chybí však studie o interakcích s biologickými elementy v ráně. V literatuře se hovoří pouze

o interakcích kyseliny fusidové v PLGA s bakteriemi v ráně, do které následuje masivní uvolňování kyseliny.

Mikrobiologické, morfologické a histologické sledování *in vivo* zjistilo, že u krytí z ultratenkých vláken PLGA spolu s baktericidním léčivem zlepšilo obnovení epidermální a kožní tkáně, zvětšil se obsah kolagenu a byly minimalizovány jizvy.

Významným klinickým problémem v invazní ortopedii po vnesení implantátu jsou možné postinfekce, Gilchrist a kol. ^[34]. Kombinace kyseliny fusidové a rifampicinu v nanomembráně z PLGA umožňuje tento problém řešit. Jedná se o biodegradovatelnou soustavu vytvořenou pomocí EZ s dvojitým uvolňováním. Léčivo je umístěno na titanových implantátech do postiženého ložiska a ničí stafylokokové bakterie, zvané MRSA (methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*).

Alkanin, šikonin a jejich deriváty jsou přirozeně se vyskytující hydroxynaftochinony, které mají vysokou schopnost hojení ran, také antimikrobiální a protizánětlivou aktivitu, Kontogiannopoulos a kol. ^[35]. Jedná se o pigmenty izolované z kořenů *Alkanna tinctoria* (kamejník barvířský). Cílem práce je zkombinovat biologické vlastnosti derivátů s vlákny vytvořenými pomocí EZ. Pro tvorbu vláken se používají biokompatibilní polymery jako je acetát celulózy, PLLA, PLGA (mléčná kyselina a glykolová kyselina v poměru 50/50 nebo 75/25).

Membrána vytvořena z polyetylglykol – poly - L-mléčné kyseliny s enzymem proteinkinázou K se během biologického rozkladu rozkládala rychleji než samotná membrána bez proteinázy, Li a kol. ^[36]. Při využití membrán jako obvazového materiálu na rány je žádoucí rychlá doba rozkladu. Právě vymezení proteinkinázy K v podobě kapsulí do nanovláken umožňuje tuto podmínku splnit.

Dextran je univerzální biomakromolekula používaná pro přípravu nanovláknenných membrán buď jako bioaktivní hydrofilní látka nebo biodegradovatelný polymer. Důležitou roli při hojení ran hraje vlhké a teplé prostředí, které je dostatečně prodyšné a vykazuje baktericidní aktivitu. Uvedená membrána tyto podmínky splňuje. Ve studii Unnithana a kol. ^[37] je popsána 3D nanomembrána připravená zvlákněním z roztoku, který obsahoval dextran, polyuretan a ciprofloxacin. Tyto látky snižují výskyt G- a G+ bakterií v ráně.

Diabetické vředy na diabetické noze jsou chronické nehojící se komplikace diabetu, které mohou vést až k amputaci končetiny. Pokrok v terapii je spojen s využitím kopolymerů PLGA jako nanomembrán s léčivem, Moura a kol. ^[38].

Pro léčbu po chirurgickém šití ran se vzhledem k jeho pomalejší degradaci jeví jako vhodný polykaprolakton (PCL). Pro léčbu diabetických vředů se osvědčil kurkumin a PCL. Přírodní nebo syntetické polymery mohou být pro zlepšení účinku kombinovány nebo zesíťovány, výsledkem může být např. s genipin, oxidovaný dextran, atd.

Studie Ma a kol. ^[39] pojednává o tvorbě nanovláken z chitosanu, kyseliny hyaluronové a polyethylenoxidu (PEO), který byl po EZ jako hydrofilní pomocná látka odstraněn vodou a nanovlákná poté namočena do roztoku paclitaxelu (PTX) používaného například při léčbě karcinomu prostaty. Chitosan zde vystupuje jako polykation a kyselina hyaluronová, která byla zabudována do membrány jako polyanion. Složení polymerů mělo velký vliv na řízené uvolňování PTX a nanovláknenný přípravek je proto perspektivně vhodný na pooperační chemoterapii rakoviny prostaty.

Chitosan má v biomedicině velké možnosti využití, určité problémy se však vyskytují při zpracování vlivem vysoké viskozity soustav s obsahem chitosanu, Pillai a kol. ^[40].

Jejich vlastnosti, jako antimikrobiální aktivita, biodegradovatelnost a netoxičnost byly zkoumány za použití různých rozpouštědel, např. fluorovaných uhlovodíků, a studována disoluce v anorganických rozpouštědlech i v polárních kyselých roztocích.

Nejlepších výsledků dosahovaly deriváty chitinu a acetát nebo mravenčan chitosanu. Požadované vlastnosti vykazovala nanomembrána vytvořená z chitosanu metodou EZ z lyotropní krystalické soustavy.

Struktura chitosanu obsahuje mnoho primárních aminoskupin, které umožňují reakce s dalšími funkčními skupinami, Casettari a kol. ^[41]. Výsledkem může být zvýšená rozpustnost a zlepšená mukoadhezivita. Tyto vlastnosti je možno využít v genové terapii při přenosu nukleových kyselin. Slibné výsledky byly prezentovány s karboxymethylovaným, trimethylovaným nebo pegylovaným chitosanem. Chitosan substituovaný histidinem, lysinem nebo fenylalaninem byl zatím využit pouze u myších fibroblastů, ale studie stále pokračují.

Cílem studie Song a kol. ^[42] bylo sledování duálního uvolňování organických fluorescenčních barviv fluoresceinu (FLU) a rhodaminu B (RHB) z nanomembrány, složené z PLGA a porézního oxidu křemičitého. Po namočení membrány s RHB v roztoku s oxidem křemičitým se prodloužilo uvolňování RHB. Disoluce fluoresceinu nebyla ovlivněna. Rychlost uvolňování souvisela se strukturou membrány, Liao

a kol. ^[43]. V případě kompaktních nanomembrán bylo léčivo uvolňováno rovnoměrně, na rozdíl od membrán složených ze zesílených nanovláken.

Nanovlákná pro potravinářský průmysl jsou vyráběna z roztoku acetátu celulózy v kyselině octové a vaječného albuminu v kyselině mravenčí, Wongsasulak a kol. ^[44]. Vlastnosti jednotlivých vláken závisí na procentuálním zastoupení jednotlivých složek. Studie ukázala, že sám albumin má příliš vysoké povrchové napětí a z tohoto důvodu není schopen při elektrospiningu vytvářet jednotlivá vlákna. Přidáním acetátu celulózy a povrchově aktivní látky, např. polysorbátu 40, se snížila elektrická vodivost a povrchové napětí. Na základě toho efektu se vytvořila vlákna. Pomocí SEM nebo TEM lze pozorovat vytvořená biodegradovatelná vlákna v organismu.

Studie Tungprapa a kol. ^[45] se zabývala využitím nanovláken z acetátu celulózy pro řízené uvolňování léčiv např. indometacin, naproxen, ibuprofen, sulindak.

Lakasa je multioxidáza, která katalyzuje redukci molekulárního kyslíku na vodu spolu s oxidací substrátu, Dai a kol. ^[46]. Využívá se na odstraňování polycyklických aromatických uhlovodíků z kontaminované vody. Lakasa má vysokou absorpční aktivitu, poskytuje téměř stoprocentní absorpci. Membrána je připravena emulzním zvlákněním z PLC, PLGA nebo PLGA.

PLA je alifatický polyester tvořený ze stavebních jednotek kyseliny mléčné. Její použití je hlavně v oblastech biomedicíny a výhledově při výrobě plastů po rafinaci ropy, Lim a kol. ^[47].

Hydrofilní a hydrofobní léčiva mohou být zapouzdřena do nanomembrán tzv. emulzním elektrospiningem, Xu a kol. ^[48]. Uvolňování léčivých látek je dáno rozpouštěním v pórech membrán a závisí na vlastnostech rozpouštěných léčiv.

V uvedené studii byly studovány nanomembrány z PEG-PLA a dvě léčiva, hydrofilní doxorubicin (DOX) a hydrofobní paclitaxel (PTX), přičemž DOX difunduje z membrány rychleji než PTX. Jedná se o dvě nejvíce používaná protinádorová léčiva a právě jejich kombinace umožňuje dlouhodobé a zároveň postupné uvolňování in vitro, jak dokazují i zkoušky na myších a krysách in vivo.

Antitumorózní léčiva (např. DOX) vykazují kromě pozitivního terapeutického efektu i nežádoucí vedlejší efekty jako je myelosuprese, kardio- hepato- a nefrotoxicita, Ignatova a kol. ^[49].

Studie popisuje působení gosypolu (GOS) a kvarterizovaného chitosanu in vitro a in vivo na apoptózu buněk HeLa, které způsobují cervikální karcinom u žen ^[50]. Nanomembrána z polyfenolického GOS je vytvořena pomocí EZ, vlákna jsou potažena

kvartérním chitosanem v amorfním stavu. Chitosan s kladnými aminoskupinami reaguje se záporně nabitými biologickými membránami HeLa buněk, vyvolává změny v propustnosti buněk a inhibuje buněčný růst a dělení. Kombinace GOS s HeLa buňkami zaručuje zvýšenou apoptózu.

Sublingvální podávání léčiv je výhodné pro rychlý nástup účinku, protože obchází tzv. first past efekt, Vrbata a kol. ^[51]. Tato aplikace je potenciálně výhodná při léčení migrény látkami jako sumatriptan, naproxen nebo jejich soli. Do nanomembrány byla tato léčiva vpravena elektrospinningem v amorfní formě. Přestože léčiva vykazovala rozdílné výsledky v in vitro testech sublingvální permeace, průnik léčiv v neionizované formě z nanovláken byl několikrát rychlejší než průnik léčiv z koncentrovaných roztoků.

Vlákná vytvořená elektrospinningem, s enkapsulovaným paracetamolem, který je nestabilní v kyselém prostředí, umožňují rychlejší rozpouštění léčiva v organismu a zrychlují čas pro vytvoření nasycené koncentrace. Jako nestabilní polymer se využívá pH-senzitivní polymer obsahující esterovou skupinu v ortho poloze, Qi a kol. ^[52]. Tato vlákna byla stabilní v neutrálním prostředí, ale v kyselém dochází k jejich bouřlivé reakci. V důsledku zmenšení distribuční plochy zároveň dochází k prodloužení účinku léčiva.

Pro vmezeření léčiva kaptoprilu se používají nanomembrány z biodegradovatelných polyesterů PLLA nebo PLCL, Zhang a kol. ^[53]. Tyto polyestery vytvoří amorfní nanovlákná, jejich rozměry závisí na koncentraci polymerů.

Výsledky získané ze SEM nebo DSC ukazují rovnoměrné rozložení léčiva v amorfních vláknech a na vytvořené vodíkové vazby mezi kaptoprilem a polymerem. Uvolňování léčiva silně závisí na teplotě a pH.

Ve studii Sheng a kol. ^[54] je analyzován amoxicilin (AMX) v kombinaci s nanohydroxyapatitem (n-HAP) po vmezeření do nanovláken z PLGA, která jsou vytvořena elektrospinningem. Získaná nanomembrána má jednotnou a hladkou morfologii a je cytokompatibilní. AMX se postupně a dlouhodobě uvolňuje a úspěšně potlačuje růst *Staphylococcus aureus*. AMX se nejprve uvolňuje z n-HAP, následně z PLGA, což zaručuje prodloužení biologického poločasu a dlouhodobou antibakteriální aktivitu.

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Použité vybavení a suroviny

- Mikroskop „Nanosurf easyScan 2 Flex AFM“
- Podložní sklička
- Oboustranná lepicí páska
- Vzorky nanomembrán tvořené:
 - PCL a 15 % naproxenu
 - PCL a 30 % naproxenu
 - PAA a 5 % naproxenu
 - PVA a 10 % sumatriptanu
 - PVA a 5 % naproxenu
 - PVA a 30% diosminu
 - PAA a 5 % naproxenu
 - PVA a 3,3% kyseliny listové
 - PAA a 4 % naproxenu

Nanomembrány s léčivy byly pro zkoumání jejich materiálových a farmaceuticko technologických vlastností dodány na katedru farmaceutické technologie FaF UK z laboratoře firmy Elmarco, s.r.o., Liberec v průběhu let 2011 až 2013. Předané dokumentační protokoly k hodnoceným membránám jsou uvedeny v kap. 10. Přílohy.

5.2 Měření vzorků nanomembrán metodou AFM

Po seřízení skenovací hlavy mikroskopu jsem dané vzorky proměřila. Snímky membrán pořízené AFM podávají topografické a materiálové informace o vzorcích nanomembrán v době měření.

5.2.1 Popis a použití přístroje „Nanosurf easyScan 2 Flex AFM“

Mikroskop Nanosurf easy Scan 2 Flex AFM je zobrazen na Obr. 9 a Obr. 10. Skládá se z těchto základních částí: skenovací hlava, držák skenovacího raménka, podstavec k upevnění a posunu vzorku, kontrolní zařízení se zabudovanými nástroji k monitorování vzorku. Systém se ovládá pomocí programu Easy Scan 2.



Obr. 9: Skenovací hlava, upevňovací podstavec, zařízení pro kontrolu signálů ^[55]



Obr. 10: Skenovací hlavice se soustavou šroubů pro vyrovnaní roviny sledovaného vzorku ^[55]

Vzorky vybraných nanovláknenných membrán jsem upravila na čtverečky o velikosti asi 1 cm x 1 cm, odstranila jsem z nich podložní spunbond a připevnila je oboustrannou lepicí páskou na podložní sklička.

Vzorek jsem popsala názvem a stručnou charakteristikou (viz kap. 6.1 až 6.7).

Postupně se zapne řídicí modul mikroskopu, Controller a počítačový systém. Vzorek se vloží pod skenovací zařízení. Po výměně raménka se seřídí laserové zařízení ve skenovací hlavici.

Výška skenovací hlavice se vyrovná buď mechanicky, ručně nebo automaticky pomocí již zmíněného programu. Pro posun vzorku je možno použít dva mikrometrické šrouby (posun vlevo a vpravo nebo dopředu a dozadu).

Do skenovací hlavičky se vloží raménko, které může mít délku od 100 do 200 μm a šířku od 10 do 40 μm . V našem případě bylo vyrobeno z křemíku ^[3].

Přiblížení snímacího hrotu ke vzorku je sledováno dvěma snímacími kamerami. Raménko můžeme přiblížit ručním nebo automatickým pohybem. V druhém případě je doba přiblížení asi 10 až 15 minut (Automatic Approach). Po přiblížení na dostatečnou vzdálenost mikroskop automaticky zahájí měření. Na hlavní obrazovce se ukáže topografie vzorku, amplituda a fázový posun (tj. posunutí fází v procesu skenování, když hrot raménka identifikuje změnu profilu).

Skenovací hlava postupně monitoruje celý vzorek a získaná data se ukládají do paměti počítače. Před měřením nesmíme zapomenout vložit základní informační údaje o raménku, jako je jeho délka, šířka, rezonanční frekvence a faktor kvality.

Měřený vzorek zvětšíme na rozměr od 10 x 10 μm do 3 x 3 nm. Získaná zobrazení je možno uložit i s rozměry v souřadnicích x, y, z.

Pro měření se používají různé módy: Static Force, Dynamic Force, Phase Contrast, Force Modulation, apod.

Po skončení měření je zařízení uvedeno do pozice „Home“.

Proti vibracím je mikroskop chráněn antivibrační podložkou v čistém prostředí.

6 VÝSLEDKY MĚŘENÍ S POZNÁMKAMI

Naměřené a zaznamenané výsledky budou postupně prezentovány výslednými skeny vzorků zadaných nanovlákných membrán.

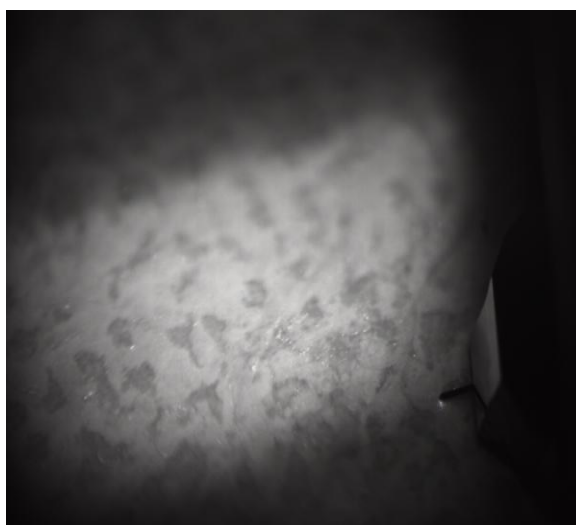
Příprava vzorku, nastavení skenovacího zařízení, přizpůsobení skenovacího raménka a vlastní proměření vzorku při různých rozměrech skenu je velice zdoluhavý proces, pohybuje se řádově v hodinách.

Nasnímaná data jsou uložena se všemi potřebnými parametry nastavení AFM na katedrálním počítači, který je vybaven příslušným přístrojovým softwarem.

Následně bude možné naskenované údaje dále zpracovávat v programu Gwyddion^[1], případně dílčím způsobem také v obecně dostupných programech typu MS Excel.

6.1 AFM nanovlákné membrány z PVA se sumatriptanem

6.1.1 Optický snímek skenované plochy



Obr. 11: Mikroskopický snímek nanovlákné membrány z polyvinylalkoholu (PVA) s 10 % sumatriptanu (SUM)

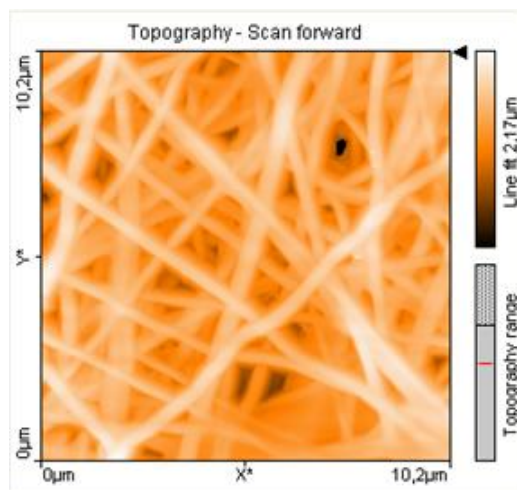
Obrázek ukazuje pohled na skenovanou plochu vzorku.

Vpravo na rozhraní světlé a tmavé plochy se nachází obraz raménka (cantileveru).

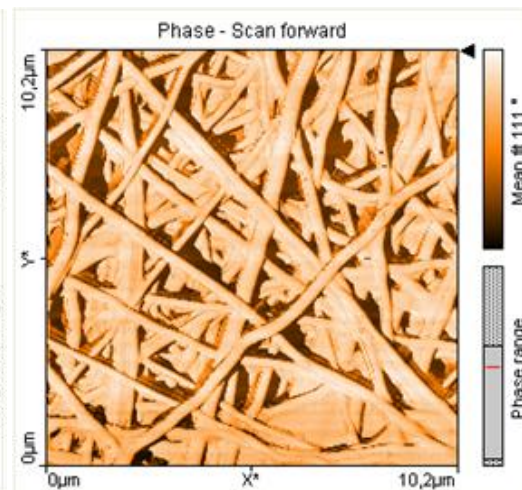
Přiblížení raménka ke vzorku je možno sledovat na monitoru počítače.

6.1.2 Membrána z PVA při rozměru skenu 10 x 10 μm

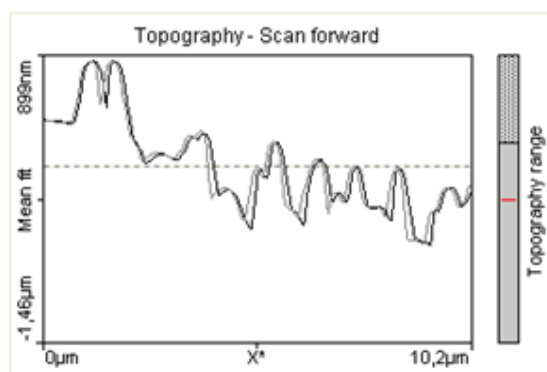
a) Topografie



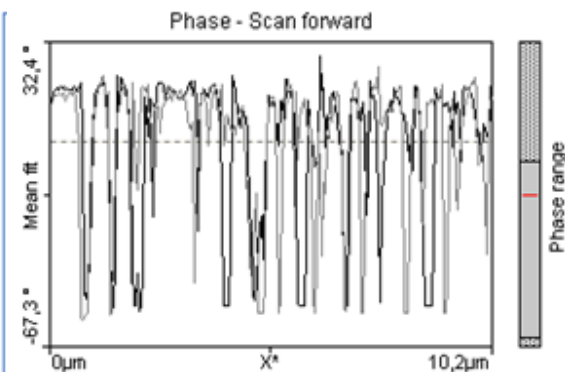
b) Fázový posun



c) Výškový profil řezu vzorku



d) Profil fázového posunu

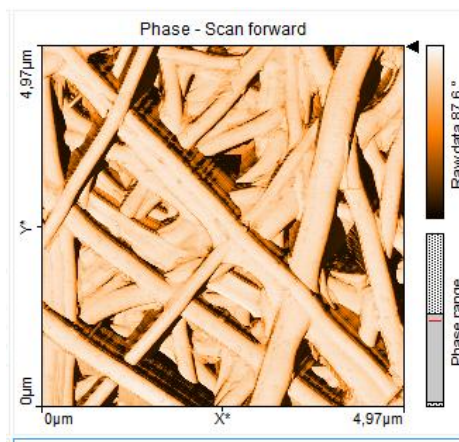


Obr. 12: AFM snímek nanovlákněné membrány z polyvinylalkoholu (PVA) s 10 % sumatriptanu 10 x 10 μm :

U obrázku 12d) se jedná o mapování s fázovým posunem.

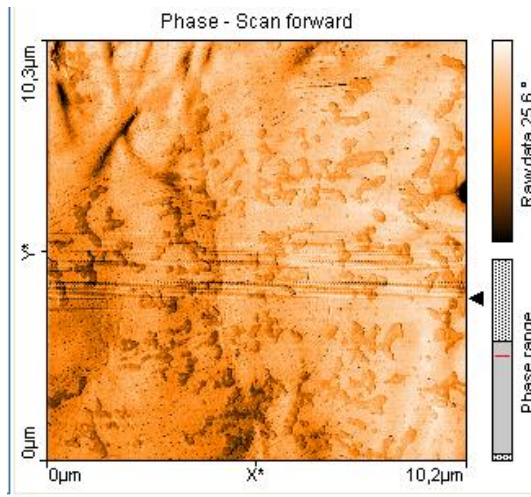
6.1.3 Membrána z PVA při rozměru skenu 5 x 5 μm

a) Fázový posun



Obr. 13: AFM snímek nanovlákněné membrány z polyvinylalkoholu (PVA) s 10 % sumatriptanu 5 x 5 μm

6.1.4 Membrána z PVA při rozměru skenu 10 x 10 μm po bočním posunu



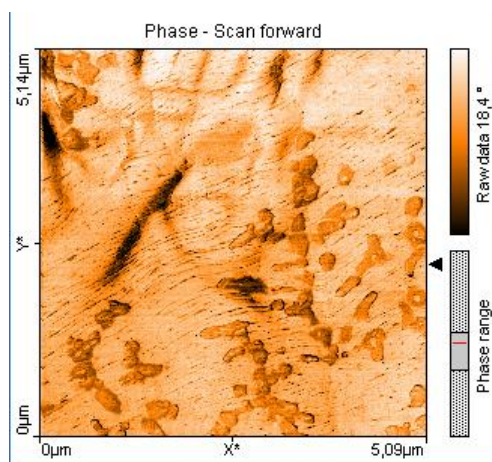
Obr. 14: AFM snímek nanovlákněné membrány z polyvinylalkoholu (PVA) a 10 % sumatriptanu 10 x 10 μm :

Jedná se o stejnou membránu jako na Obr. 12 a Obr. 13, která ale byla posunuta mikrometrickým šroubem (cca 20 μm doprava).

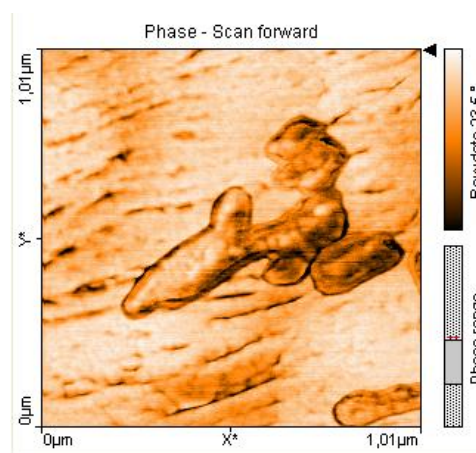
Výřez ukazuje nehomogenní oblast nanomembrány charakteristické existencí slitků polymeru s obsahem léčiva.

6.1.5 Detaily slitků na membráně z PVA

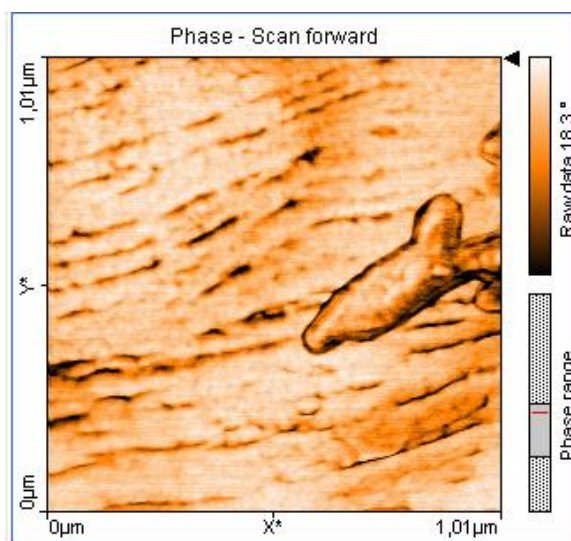
a) Oblast se slitky při skenu 5 x 5 μm



b) Oblast se slitky při skenu 1 x 1 μm



c) Posunutá oblast se slitky při skenu 1 x 1 μm



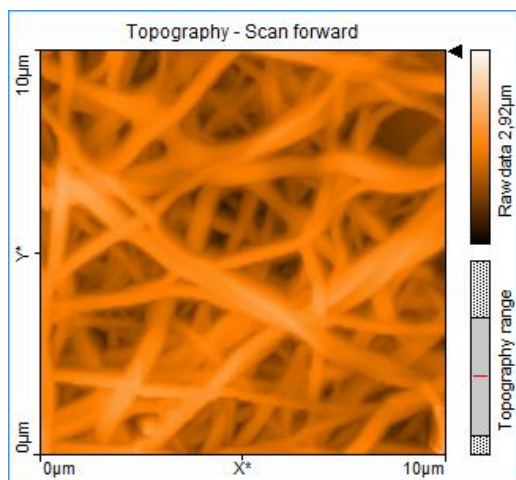
Obr. 15: AFM snímek nanovlákněné membrány z polyvinylalkoholu (PVA) a 10 % sumatriptanu 10 x 10 μm .

Na Obr. 15 je zobrazena stejná oblast vlákna jako na Obr. 14 při použití jiného zvětšení.

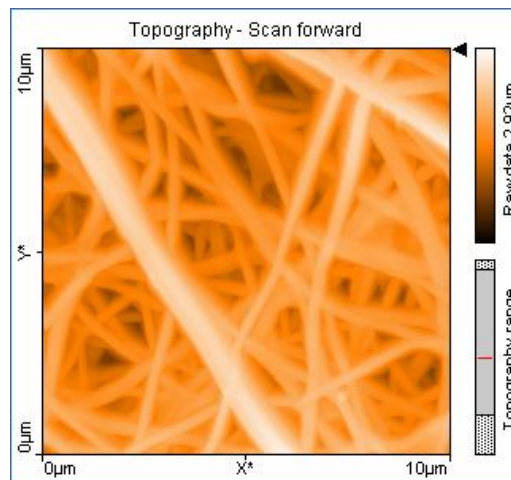
Na obrázku vystupují ze slitky zřejmě krystaly sumatriptanu, nebo se jedná o artefakty měření.

6.2 AFM membrány z PAA s naproxenem

a) Topografie



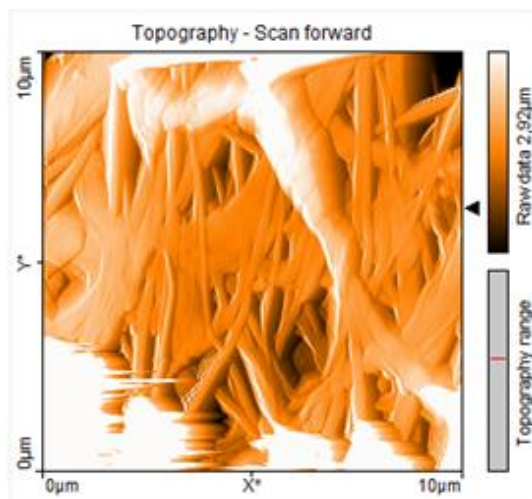
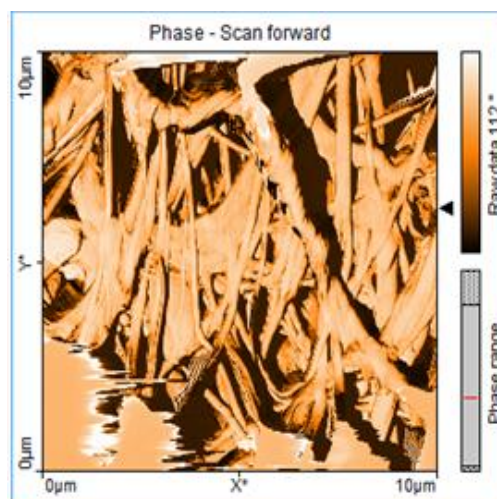
b) Topografie (jiné místo vzorku)

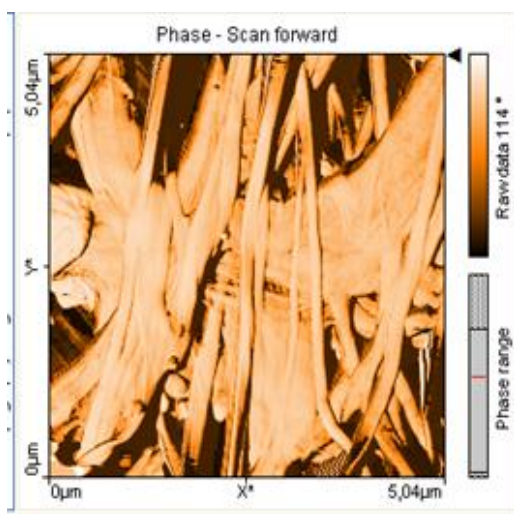
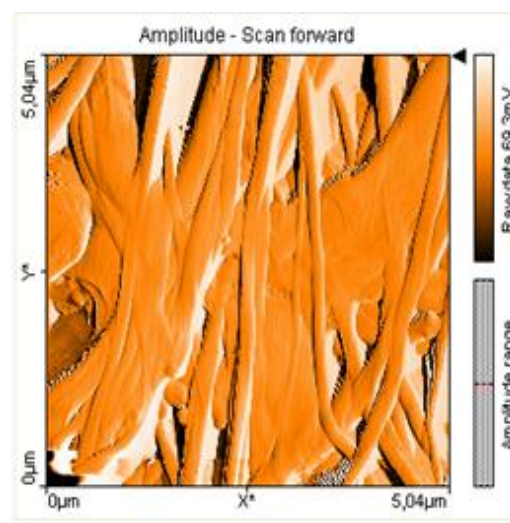


Obr. 16: Mikroskopický snímek nanovláknenné membrány z polyakrylové kyseliny (PAA) a 5 % naproxenu 10 x 10 μm :

Tyto snímky je možné považovat za nejdůležitější. Naproxen se ve vláknech nachází v amorfní formě, na jednotlivých snímcích jsou vidět vlákna, léčivo je homogenně rozptýleno ve struktuře vlákna.

6.2.1 Membrána z PAA s naproxenem, jiný pohled

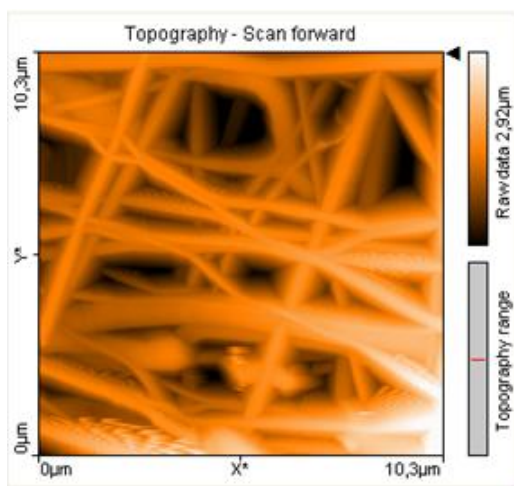
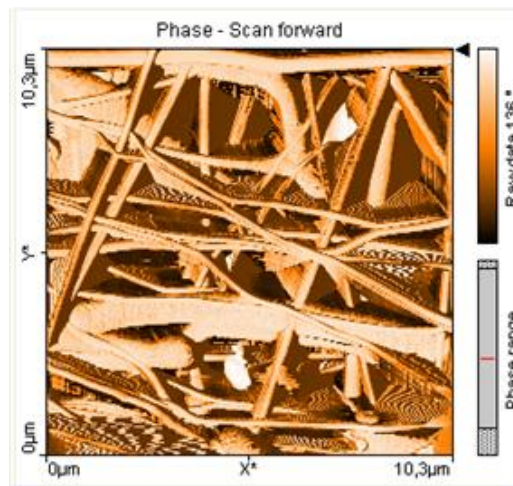
a) Topografie 10 x 10 μm b) Fázový posun 10 x 10 μm 

c) Fázový posun 5 x 5 μm d) Amplituda 5 x 5 μm 

Obr. 17: Mikroskopický snímek nanovlákněné membrány z polyakrylové kyseliny (PAA) a 5 % naproxenu

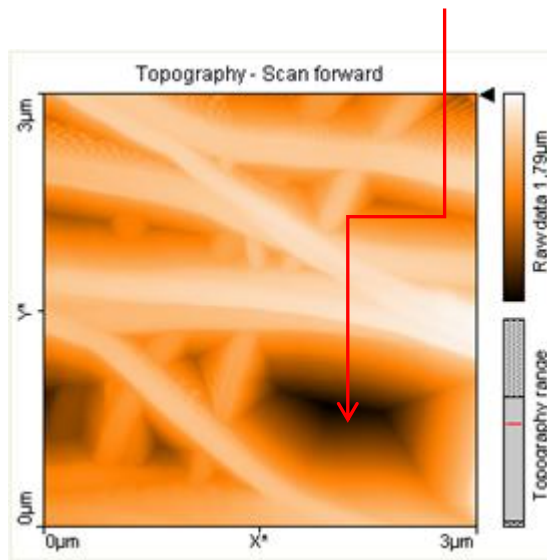
V tomto případě jde o odlišný vzorek oproti membráně na Obr. 16.

6.3 AFM membrány PCL s naproxenem

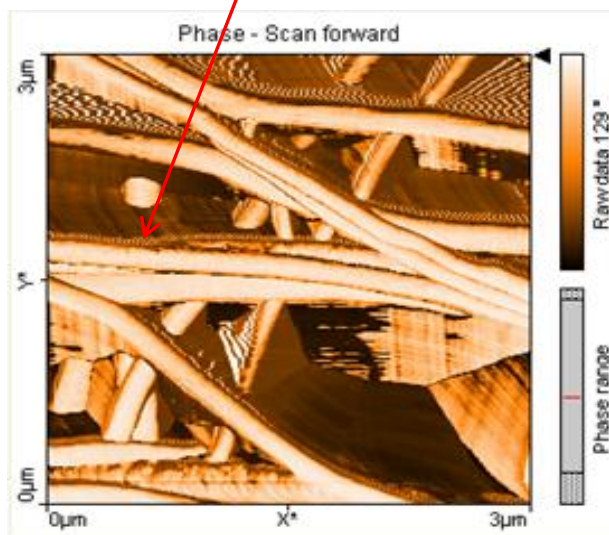
a) Topografie 10 x 10 μm b) Fázový posun 10 x 10 μm 

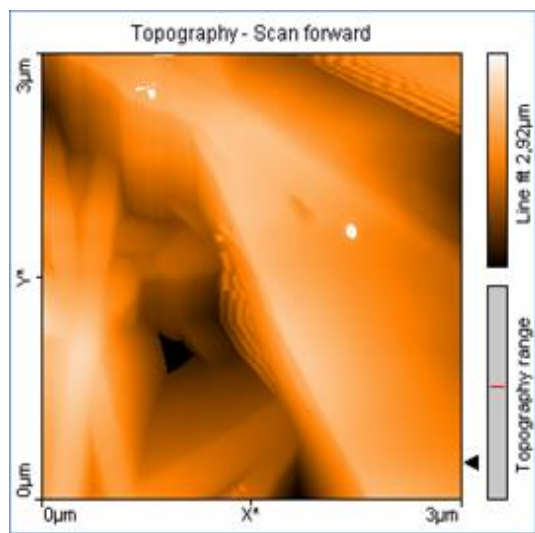
c) Topografie 3 x 3 μm

Černé místo zobrazuje část vzorku, kde jsou pravděpodobně vlákna mimo dosah hrotu raménka.

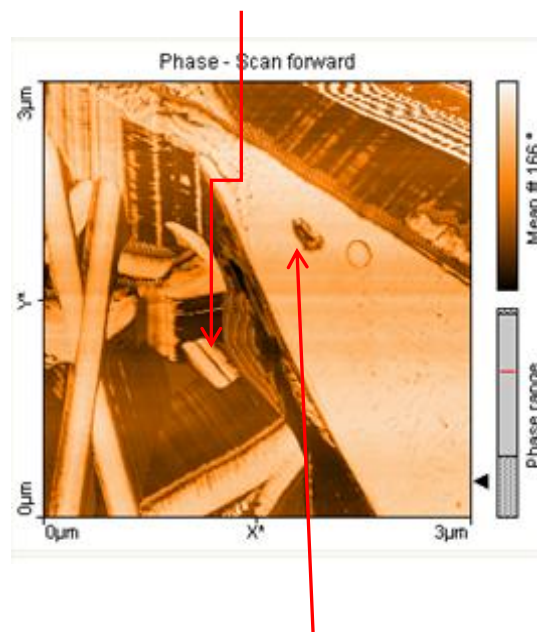
d) Fázový posun 3 x 3 μm

V levé části je mezi vlákny vidět vlákno, které prochází pod horní vrstvou vláken

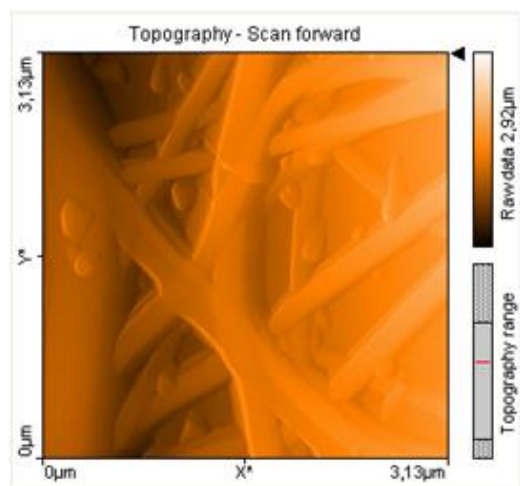


e) Topografie 3 x 3 μm f) Fázový posun 3 x 3 μm

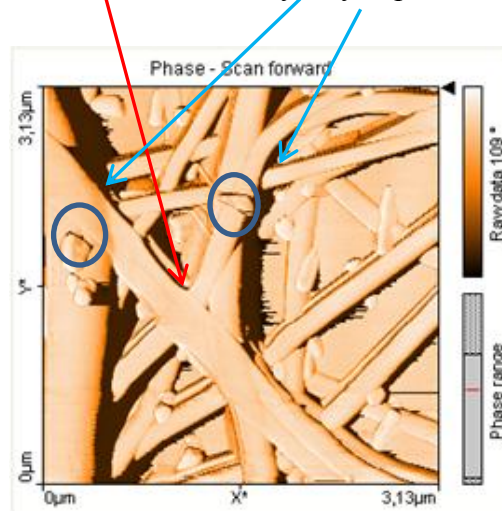
(Vlákna PCL)



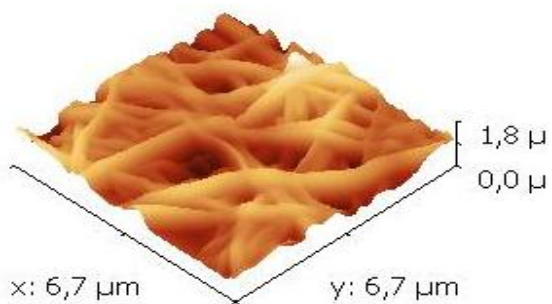
Jedná se o vlákno, které vystupuje nahoru, nebo je to slitek polymeru (PCL)

g) Topografie 3 x 3 μm h) Fázový posun 3 x 3 μm

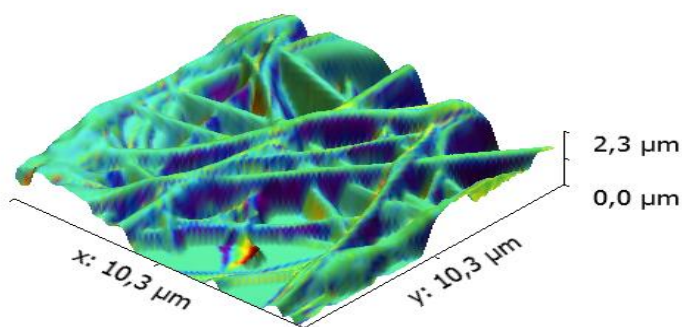
(Vlákna PCL a krystaly naproxenu)



i) Zobrazení 3D topografie 6 x 6 μm



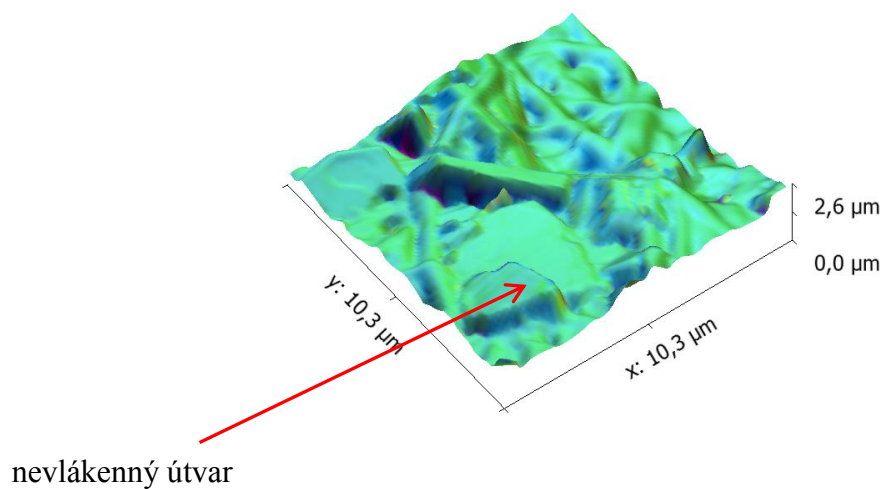
j) Zobrazení 3D topografie 10 x 10 μm



Obr. 18: AFM snímky nanovlákněné membrány z 12 % polykaprolaktonu (PCL) s 5 % naproxenu; detaily a) až j)

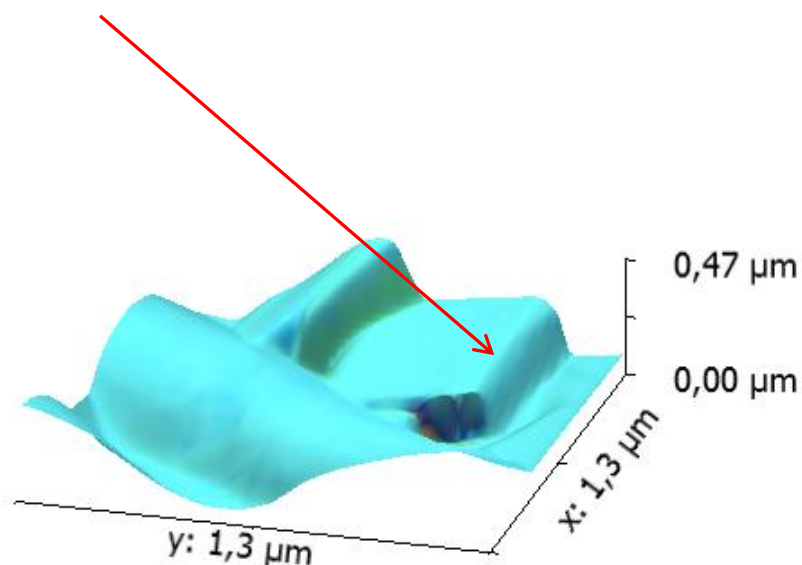
6.4 AFM membrány z HPC, PEO a PVA s diosminem

a) Zobrazení 3D topografie 10 x 10 μm



b) Zobrazení 3D topografie 1 x 1 μm

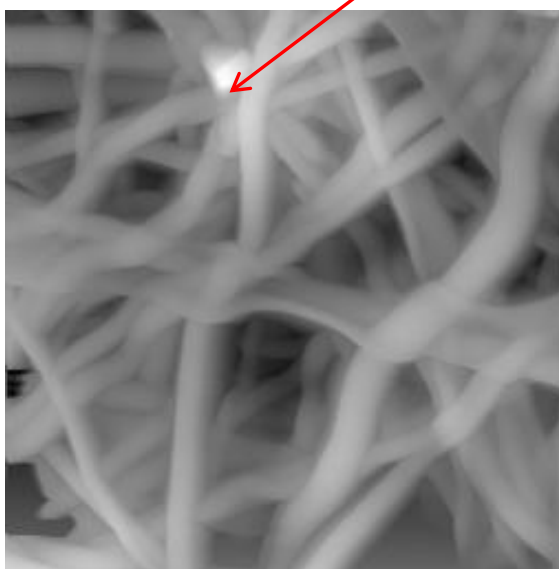
nevláknitý útvar, pravděpodobně se jedná o krystal diosminu



Obr. 19: Snímek nanovlákněné membrány z HPC, PEO a PVA s diosminem

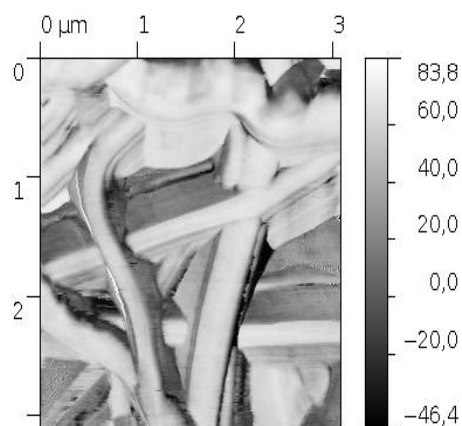
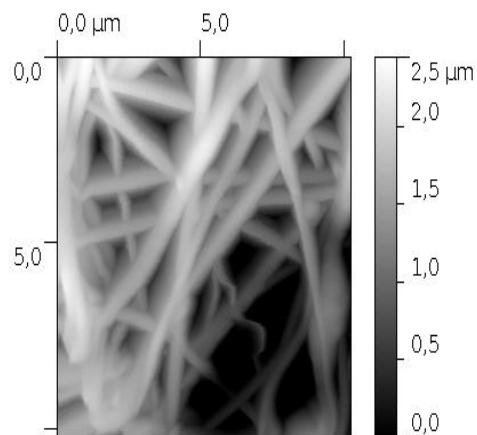
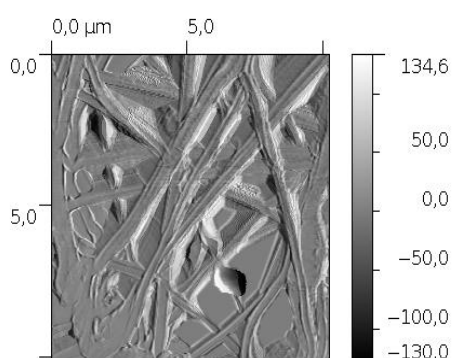
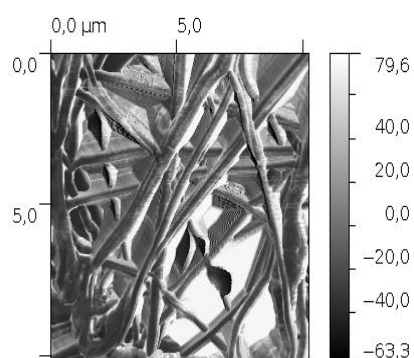
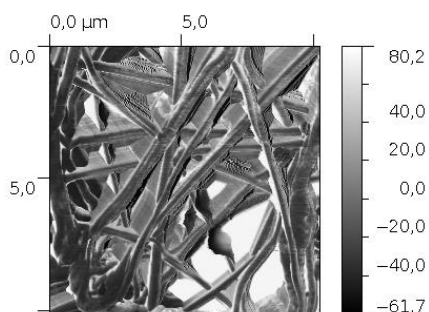
6.5 AFM membrány z PVA s kyselinou listovou

v horní části je patrný krystalek kyseliny listové nebo kus vlákna PVA



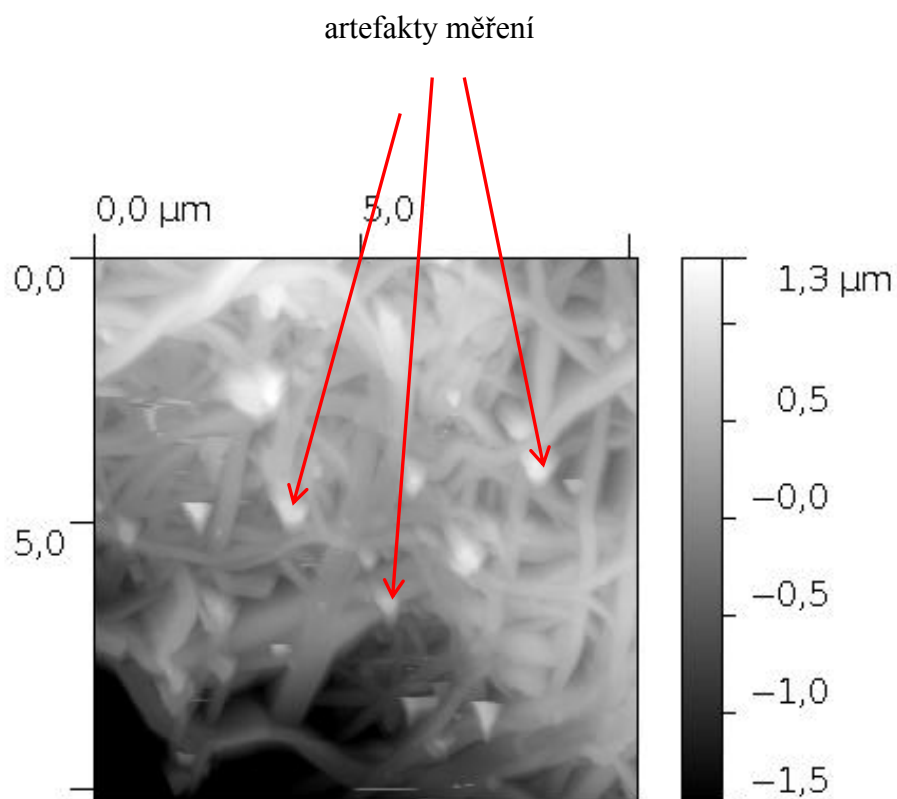
Obr. 20: Mikroskopický snímek nanovlákněné membrány z PVA s kyselinou listovou zpracovaný v programu Gwyddion (10 x 10 μm)

6.6 Membrána z PVA s naproxenem v různých režimech AFM

a) Fázový posun 80 x 80 μm b) Topografie 3 x 3 μm c) Amplituda 130 x 130 μm d) Amplituda 79 x 79 μm e) Zvětšený fázový posun 80 x 80 μm 

Obr. 21: Mikroskopický snímek nanovláknenné membrány z PVA 5 % naproxenu po zpracování v programu Gwyddion

6.7 Nanomembrána z PVA síťovaná kyselinou trihydrogenfosforečnou v programu Gwyddion



Obr. 22: AFM nanovláknenné membrány z PVA síťované trihydrogenfosforečnou zpracovaný v programu Gwyddion (1,3 x 1,3 μm)

7 ZÁVĚRY

1. Klíčové slovo „medicated nanofibrous membrane“ se vyskytovalo v článcích na portálu www.sciencedirect.com 44krát a zpracovaná rešerše rozsáhle informuje o možnostech využití v terapii, tkáňovém inženýrství a také o různých způsobech přípravy jednotlivých nanovláknenných membrán.
2. Vybrané nanomembrány hodnocené mikroskopem „easyScan 2 FlexAFM“, poskytly snímky s dobrým rozlišením až na úrovni cca 4nm (1 μ m/256bodů) a ukázaly struktury nanovláken s jednotlivými léčivy.
3. Na snímcích bylo možné rozlišit krystaly sumatriptanu, jeho nanovláknenné polymerní slitky a také možné artefakty měření.
4. Naproxen vmezeřený do nanomembrány z PAA, se ve vláknech nacházel v amorfnní formě.
5. U membrán s vlákny z PCL byly zřetelně patrné krystalky léčiv, diosmin a kyselina listová v našem pozorování výrazně vystupovaly jako jednotlivé krystalky.
6. Byla ověřena komunikace s vyhodnocovacím programem Gwyddion 4.
7. Doporučení: rozšířit AFM hodnocení například zaměřením se na jeden druh léčiva a zkoumat výskyt krystalických podílů léčiva ve/na vláknech z různých polymerů v závislosti na jeho koncentraci.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AFM	mikroskopie atomárních sil
AMX	Ampicilin
DOX	Doxorubicin
ES	elektrostatické sprejování
EZ	Elektrospining
FLU	Fluorescein
HPC	hydroxypropylcelulosa
KET	Ketoprofen
KZ	koaxiální zvlákňování
MZ	mokrý zvlákňování
NSAID	nesteroidní antiflogistikum
PAA	kyselina polyakrylová
PCL	Polykaprolakton
PEO	Polyethylenoxid
PEU	Polyesterurethan
PGA	kyselina polyglykolová
PLA	kyselina polymléčná
PLCL	poly - L - laprolakton
PLLA	poly - L - mléčná kyselina
PTX	Paklitaxel
PVA	polyvinylalkohol
PVB	Polyvinylbutyral
PVC	Polyvinylchlorid
RHB	rhodamin

SEM	skenovací elektronová mikroskopie
SPM	rastrová sondová mikroskopie
STM	skenovací tunelová mikroskopie
SUM	Sumatriptan
TAM	Tamoxifen
TEM	transmisní elektronová mikroskopie

9 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Binnig, G.; Quate, C. F.: Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters* 56, (9), 1986, s. 930–933.
- [2] Andreas, G., Joachim, H. W.: Electrospinnig: A fascinating Method for the Preparation of Ultrathin Fibers. Weinheim 2007. *Angewandte Chemie InterScience*. 46, 2007, s. 5670 - 5703
- [3] Kubínek, R.: *Rastrovací sondová mikroskopie* (s využitím materiálů firmy Thermomicroscopes). Olomouc, 2000., Katedra experimentální fyziky, Přírodovědecká fakulta UP v Olomouci. 55 s.
- [4] Huang, Z. M, Zhang, Y. Z, Kotaki M, Ramakrishna S.: A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology* 63, 2003, s. 2223–2253.
- [5] Szentivanyi, A., Chakradeo, T., Zernetsch, H., Glasmacher, B.: Electrospun cellular microenvironments: Understanding controlled release and scaffold structure. *Advanced Drug Delivery Reviews* 63, 2011, s. 209-220.
- [6] Ma, G., Fang, D., Liu, Z.Y., Zhu, X., Nie, J.: Electrospun sodium alginate (ethylene oxide) core - shell nanofibers scaffolds potential for tissue engineering applications. *Carbohydrate Polymers* 87, 2012, s. 737-743.
- [7] Qi, R., Guo, R., Hui Liu, F.Z., Yu, J., Shi, X.: Controlled release and antibacterial activity of antibiotic-loaded electrospun halloysite/poly (lactic-co-glycolic acid) composite nanofibers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 110, 2013, s. 148-155.
- [8] Koombhongse, S., Liu, W., Reneker, D H.: *Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics* 39, 2001, s. 3909-4325.
- [9] Elmarco [online]. www.elmarco.com/upload/soubory/dokumenty/66-1-1-mrs-fall-boston-09.pdf [dostupné 2014-05-09].
- [10] Frenot, A., Chronakis, I.: Polymer nanofibers assembled by elektrospinning. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 8, 2003, s. 64-75.
- [11] Gregory, C. R, Fridrikh, S. V.: Formation of fibers by electrospinning. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59, 2007, s. 1384-1391.
- [12] Park, S. I., Barett, R. C.: Design Considerations for an STM System methods of Experimental Physics. *Scanning Tunneling Microscopy*. 27, 2007, s. 31-76.

- [13] Bowen, W. R, Robert, W., Lovitt, W., Chris, J. W.: Application of atomic force microscopy to the study of micromechanical properties of biological materials. *Biotechnology Letters* 22, 2000, s. 893–903.
- [14] Klang, V., Claudia V., Matsko, N. B.: Electron microscopy of pharmaceutical systems., *Micron* 44, 2013, s. 45-74.
- [15] Liang, D., Hsiao, B. S., Chu, B.: Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59, 2007, s. 1392-1412.
- [16] Zhang, Z., Hu, J., Ma, P. X.: Nanofiber - based delivery of bioactive agents and stem cells to bone sites. *Advanced Drug Delivery Reviews* 64, 2012, s. 1129-1141.
- [17] Kim, T. G., Lee, D. S., Park, T. G.: Controlled protein release from electrospun biodegradable fiber mesh composed of pol (ϵ -caprolactone) and poly (ethylene oxide). *International Journal of Pharmaceutics* 338, 2007, s. 276-283.
- [18] Chakraborty, S., Liao, I., Ch., Adler, A., Leong, K. W.: Electrohydrodynamics: A facile technique to fabricate drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61, 2009, s. 1043-1054.
- [19] Yu, D. G., Yu, J. H., Chen, L., Williams, G. R., Wang. X.: Modified coaxial electrispinning for the preparation of high-quality ketoprofen-loaded cellulose acetate nanofibers. *Carbohydrate Polymers* 90, 2012, s. 1016-1023.
- [20] Maretschek, S., Greiner, A., Kissel, T.: Electrospun biodegradable nanofiber nonwovens for controlled release of proteins. *Journal of Controlled Release* 127, 2008, s. 180-187.
- [21] Nie, H. L., Ma, Z. H., Fan, Z. X., Branford-White, Ch. J.: *International Journal of Pharmaceutics* 373, 2009, s. 4-9.
- [22] Dong, W. PhD, Zhang, T. PhD, McDonald, M.BSc, Padilla, C. BSc, Epstein, J. DSc, Tian, Y. R. PhD.: Biocompatible nanofiber scaffolds on metal for controlled release and cell colonization. *Nanotechnology, Biology and Medicine* 2, 2006, s. 248-252.
- [23] Yoo, H. S., Kim, T. G., Park, T. G.: Surface - unctionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery. *Drug Delivery Reviews* 61, 2009, s. 1033-1042.
- [24] Liu, S., Zhao, J., Ruan, H., Wang, W., Wu, T., Cui, W., Fan, C.: Antibacterial and anti-adhesion effects of the silver nanoparticles – loaded poly (L-lactide) fibrous membrane. *Materials Science and Engineering C* 33, 2013, s. 1176-1182.


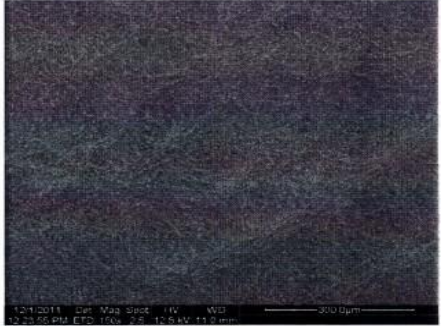
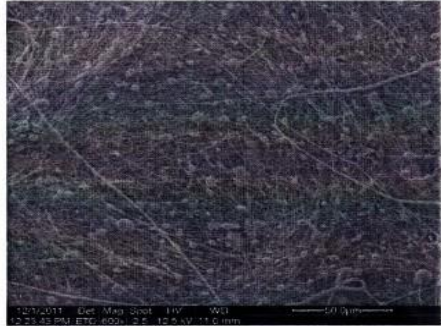

- [25] Ionescu, L. C., Lee, G. C., Sennett, B. J., Burdick, J. A., Mauck, R. L.: An anisotropic nanofiber/microsphere composite with controlled release of biomolecules for fibrous engineering. *Biomaterials* 31, 2010, s. 4113-4120.
- [26] Obata, A., Hotta, T., Wakita, T., Ota, Y., Kasuga, T.: Electrospun microfiber meshes of silicon-doped vaterite/poly (lactic acid) hybrid for guided bone regeneration. *Acta Biomaterialia* 6, 2010, s. 1248-1257.
- [27] Cencetti, C., Bellini, D., Pavesio, A., Senigaglia, D., Passariello, C., Virga, A., Matricardi, P.: Preparation and characterization of antimicrobial wound dressings based on silver, gellan, PVA and borax. *Carbohydrate Polymers* 90, 2012, s. 1362-1370.
- [28] Jiang, Y. N., Mo, H. Y., Yu, D. G.: Electrospun drug-loaded core-sheath PVP/zein nanofibers for biphasic drug release. *International Journal of Pharmaceutics* 438, 2012, s. 232-239.
- [29] Zu, D. G., Xia Wang, W. Ch., Li, Z., Liao, Z. L.: Linear drug release membrane prepared by a modified coaxial electrospinning process. *Journal of Membrane Science* 428, 2013, s. 150-156.
- [30] Lu, Y., Jiang, H., Tu, K., Wang, L.: Mild immobilization of diverse macromolecular bioactive agents onto multifunctional fibrous membranes prepared by coaxial electrospinning. *Acta Materialia*, 2009, s. 1742-2061.
- [31] Thakur, R. A., Florek, C. A., Kohn, J., Michniak, B. B.: Electrospun nanofibrous polymeric scaffold with targeted drug release profiles for potential application as wound dressing. *International Journal of Pharmaceutics* 364, 2008, s. 87-93.
- [32] Amina, M., Amna, T., Hassan, M. S., Ibrahim, T. A., Khil, M. S.: Facile single mode electrospinning way for fabrication of natural product based silver decorated polyurethane nanofibrous membranes: Prospective medicated bandages. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 425, 2013, s. 115-121.
- [33] Said, S. S., El-Halfawy, O. M., El-Gowell, H. M., Aloufy, A. K., Boraei, N. B., El-Khordagui, L. K.: Bioburden-responsive antimicrobial PLGA ultrafine fibers for wound healing. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 80, 2012, s. 85-94.
- [34] Gilchrist, S. E., Lange, D., Letchford, K., Bach, H., Fazli, H., Burt, H. M.: Fusidic acid and rifampicin co-loaded PLGA nanofibers for the prevention of orthopedic implant associated infections. *Journal of Controlled Release* 170, 2013, s. 64-73.

- [35] Kontogiannopoulos, K. N., Assimopoulou, A. N., Panayiotou, I. T. C., Papageorgiou, V. P.: Electrons spun fiber mats containing shikonin and derivatives with potential biomedical applications. *International Journal of Pharmaceutics* 409, 2011, s. 216-228.
- [36] Li, X., Zhang, H., Li, H., Tang, G., Zhao, Y., Yuan, X.: Self-accelerated biodegradation of electrospun poly (ethylene glycol)-poly (L-lactide) membranes by loading proteinase K. *Polymer Degradation and Stability* 93, 2008, s. 618-626.
- [37] Unnithan, A. R., Barakat, N. A. M., Tirupathi Pichiah, P. B., Gnanasekaran, G., Nirmala, R., Cha, Y. S., Jung, CH. H., Newehy, Kim, H. Y.: Wound-dressing materials with antibacterial activity from electrospun polyurethane-dextran nanofiber mats containing ciprofloxacin HCL. *Carbohydrate Polymers* 90, 2012, s. 1786-1793.
- [38] Moura, L. I., F., Dias, A. M. A., Carvalho, E., Sousa. H. M.: Recent advances on the development of wound dressings for diabetic foot ulcer treatment-A *Acta Biomaterialia* 9 2013, s. 7093-7114s.
- [39] Ma, G., Liu, Z., Peng, Ch., Fang, D., He, B., Nie, J.: Paclitaxel loaded electrospun porous nanofibers as mat potential application for chemotherapy against prostate cancer. *Carbohydrate Polymers* 86, 2011, s. 505-512.
- [40] Pillai, C. K. S., Paul, W., Sharma, Ch. P.: Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science* 34, 2009, s. 641-678.
- [41] Casettari, L., Vllasaliu, D., Lam, J. K. W., Soliman, M., Illum, L.: Biomedical applications of amino acid-modified chitosans: *Acta Biomaterials* 33, 2012, s. 7565-7583.
- [42] Song, B., Wu, Ch., Chang, J.: Dual drug release from electrospun poly (lactic-co-glycolic acid)/mesoporous silica nanoparticles composite mats with distinct release profiles. *Acta Biomaterialia* 8, 2012, s. 1901-1907.
- [43] Liao, Y., Zhang, L., Gao, Y., Tao Zhu, Z., Fong, H.: Preparation, characterization, and encapsulation/release studies of a composite nanofiber mat aelectrospun from an emulsion containing poly (lactic-co-glycolic acid). *Polymer* 49, 2008, s. 5294-5299.
- [44] Wongsasulak, S., Patapeejumruswong, M., Weiss, J., Supaphol, P., Yoovidhya, T.: Elecstrospinning of food-grade nanofibers from cellulose acetate and egg albumen blends. *Journal of Food Engineering* 98, 2010, s. 370-376.


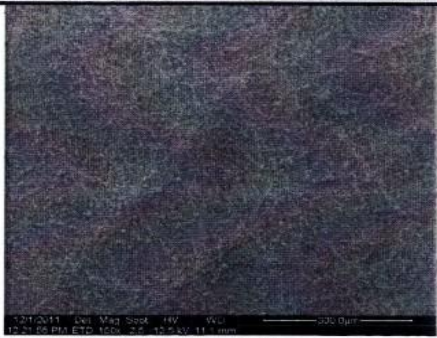
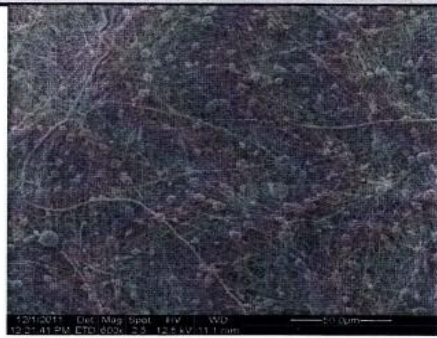




- [45] Tungprapa, S., Jangchud, I., Supaphol, P.: Release characteristics of four model drugs from drug-loaded electrospun cellulose acetate fiber mats. *Polymer* 48, 2007, s. 5030-5041.
- [46] Dai, Y., Niu, J., Yin, L., Xu, J., Xu, J.: Laccase-carrying electrospun fibrous membrane for the removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated water. *Separation and Purification Technology* 104, 2013, s. 1-8.
- [47] Lim, L., T., Auras, R., Rubino, M.: Processing technologies for poly (lactic acid). *Progress in Polymer Science* 33, 2008, s. 820-852.
- [48] Xu, X., Chen, X., Wang, Z., Jing, X.: Ultrafine PEG-PLA fibers loaded with both paclitaxel and doxorubicin hydrochloride and their in vitro cytotoxicity. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 72, 2009, s. 18-25.
- [49] Ignatova, M., Manolova, N., Toshkova, R., Rashkov, I., Gardeva, E., Yossifova, L., Alexandrov, M.: Quaternized chitosan-coated nanofibrous materials containing gossypol: Preparation by electrospinning, characterization and antiproliferative activity towards HeLa cells. *International Journal of Pharmaceutics* 436, 2012, s. 10-24.
- [50] Henrietta Lacks (<http://en.wikipedia.org/wiki/HeLa>)
- [51] Vrbata, P., Berka, P., Stránská, P., Doležal, P., Musilová, M., Čížinská, L.: Electrospun drug loaded membranes for sublingual administration of sumatriptan and naproxen. *International Journal of Pharmaceutics* 157, 2013, s. 168-175.
- [52] Qi, M., Li, X., Yang, Y., Zhou, S.: Electrospun fibers of acid-labile biodegradable polymers containing ortho ester groups for controlled release of paracetamol. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 70, 2008, s. 445-452.
- [53] Zhang, H., Lou, S., Williams, G. R., White, Ch. B., Nie, H., Quan, J., Zhu, L. M.: A systematic study of captopril-loaded polyester fiber mats prepared by electrospinning. *International Journal of Pharmaceutics* 439, 2012, s. 100-108.
- [54] Zheng, F., Wang, S., Wen, S., Shen, M., Zhu, M., Shi, X.: Characterization and antibacterial activity of amoxicillin-loaded electrospun nano-hydroxyapatite/poly(lactic-co-glycolic acid) composite nanofibers. *Biomaterials* 34, 2013, s. 1402-1412.

10 PŘÍLOHY




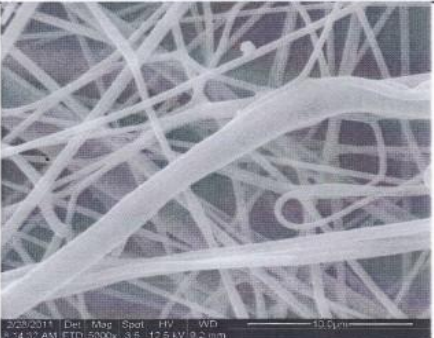



10.1 Příloha číslo 1-Membrána z PCL a naproxenu

Sample dispatch note						 ELMARCO <small>NANO FOR LIFE</small>		
Sample ID	DRM_111130_PCL+naproxen_6							
Customer	UK HK	Elmarco contact (Sales)		Stránská Denisa				
Dispatch date	30.11.2011	Elmarco contact (R&D)		Pěničková Jitka				
SAMPLE DETAILS								
Crosslinked (Y/N)	N	Substrate		PP spunbond modrý				
Polymer	polykaprolakton, naproxen 30hm% na sušinu, 12% roztok PCL							
Defects								
Measuring parameters								
Properties	Measured value	Unit	coeff. of variation	Number of measurements	Timing of measurements	Value	Result	Method description
Basis weight	5,3	gsm		3			OK	peeling and weighting material
Fiber diameter	169,8	nm	±34,9	40			OK	SEM picture analysis
Adhesion	-	-	-				OK	Internal scale Elmarco 0-none 5-total
Sample volume	2	A4						
Temperature	23	°C						
Humidity	26	%						
SAMPLE IMAGE								
								
				Image magnificatio <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="width: 20px; height: 20px; background-color: black; margin-right: 5px;"></div> <div style="width: 20px; height: 20px; background-color: white; margin-right: 5px;"></div> <div style="margin-right: 10px;">150 x</div> <div style="flex-grow: 1;">image name: <u>xxx.150.jpg</u></div> </div> <div style="display: flex; align-items: center; margin-top: 10px;"> <div style="width: 20px; height: 20px; background-color: black; margin-right: 5px;"></div> <div style="width: 20px; height: 20px; background-color: white; margin-right: 5px;"></div> <div style="margin-right: 10px;">600 x</div> <div style="flex-grow: 1;">image name: <u>xxx.600.jpg</u></div> </div> <div style="display: flex; align-items: center; margin-top: 10px;"> <div style="width: 20px; height: 20px; background-color: black; margin-right: 5px;"></div> <div style="width: 20px; height: 20px; background-color: white; margin-right: 5px;"></div> <div style="margin-right: 10px;">20000 x</div> <div style="flex-grow: 1;">image name: <u>xxx.20000.jpg</u></div> </div>				
Notes:								








10.2 Příloha číslo 2-Membrána z PCL a naproxenu

Sample dispatch note								 NANO FOR LIFE	
Sample ID	DRM_111130_PCL+naproxen_4								
Customer	UK HK		Elmarco contact (Sales)			Stránská Denisa			
Dispatch date	30.11.2011		Elmarco contact (R&D)			Pěničková Jitka			
SAMPLE DETAILS									
Crosslinked (Y/N)	N			Substrate			PP spunbond modrý		
Polymer	polykaprolakton, naproxen 15hm% na sušinu, 12% roztok PCL								
Defects									
Measuring parameters									
Properties	Measured value	Unit	coeff. of variation	Number of measurements	Timing of measurements	Value	Result	Method description	
Basis weight	5,5	gsm		3			OK	peeling and weighting material	
Fiber diameter	169,8	nm	±34,9	40			OK	SEM picture analysis	
Adhesion	-	-	-				OK	Internal scale Elmarco 0-none 5-total	
Sample volume	2	A4							
Temperature	23	°C							
Humidity	26	%							
SAMPLE IMAGE									
									
					Image magnificatio <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;">  150 x </div> <div>image name: xxx.150.jpg</div> </div> <div style="margin-top: 10px;"> <div style="margin-right: 10px;">  600 x </div> <div>image name: xxx.600.jpg</div> </div> <div style="margin-top: 10px;"> <div style="margin-right: 10px;">  20000 x </div> <div>image name: xxx.20000.jpg</div> </div>				
Notes:									



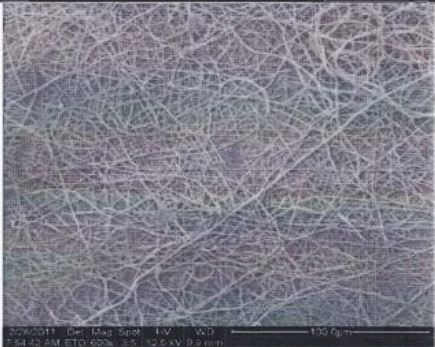

10.3 Příloha číslo 3-Membrána z PAA a naproxenu

Sample dispatch note						 ELMARCO NANO FOR LIFE		
Sample ID	DRM_110228_PAA+API_2							
Customer	UK HK	Elmarco contact (Sales)		Stránská Denisa				
Dispatch date	28.2.2011	Elmarco contact (R&D)		Klabanová Adéla				
SAMPLE DETAILS								
Polymer	(PAA+5% API 1)			Substrate	PP spunbond modrý			
Crosslinked (Y/N)	Y							
Defects	výskyt silnějších vláken - vousů na povrchu vrstvy							
Measuring parameters								
Properties	Measured value	Unit	coeff. of variation	Number of measurements	Timing of measurements	Value	Result	Method description
Basis weight	1,7	gsm		5			OK	peeling and weighting material
Fiber diameter	380,8	nm	±50,2	30			OK	SEM picture analysis
Adhesion	4	-	-				OK	Internal scale Elmarco 0-none 5-total
Sample volume	1	A4						
Temperature	22	°C						
Humidity	25	%						
SAMPLE IMAGE								
								
				<p>Image magnification</p> <p>  150 x image name: xxx.150.jpg </p> <p>  600 x image name: xxx.600.jpg </p> <p>  5000 x image name: xxx.5000.jpg </p>				
Notes:								
<p>RD 09 Sample dispatch note / 04.10.2010 / Rev. 4 / Malý,Vasková / Popp / Soubor: G:\Oddelení\vyvoj\21_Medical application\Granty\Lečiva\04_Drug release membranes\2011\polymery_vzorky\API, API1\příručky\DRM_110228_PAA+API_2 / Strana: 1 z 1 / Vytiskáno: 1.3</p>								

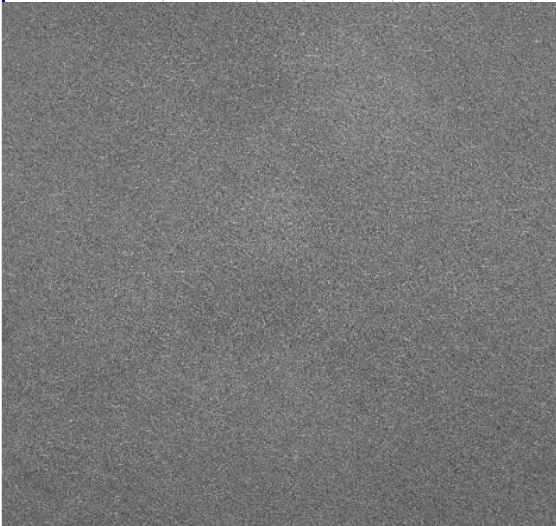
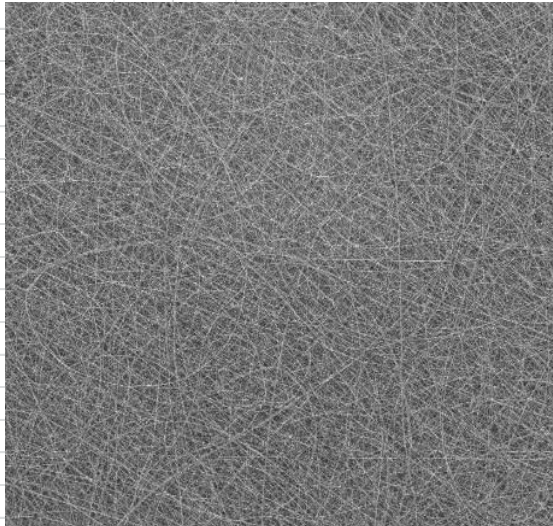
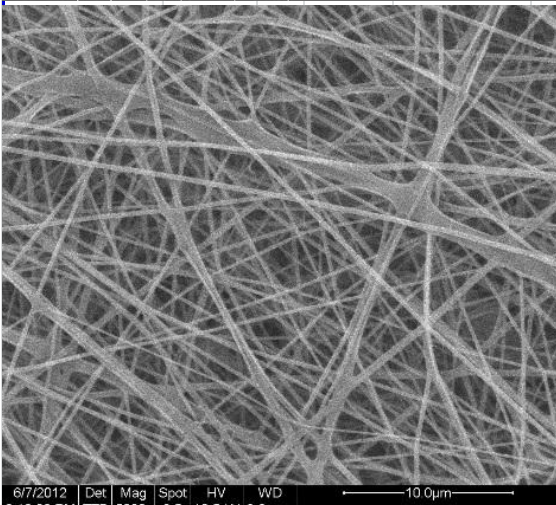



10.4 Příloha číslo 4-Membrána z PVA a SUM

Sample dispatch note					 NANO FOR LIFE			
Sample ID	DRM_110503_PVA+STT_1							
Customer	UK HK	Elmarco contact (Sales)	Stránská Denisa					
Dispatch date	17.5.2011	Elmarco contact (R&D)	Klabanová Adéla					
SAMPLE DETAILS								
Polymer	(PVA+10%STT)		Substrate	PP spunbond modrý				
Crosslinked (Y/N)	Y							
Defects								
Measuring parameters								
Properties	Measured value	Unit	coeff. of variation	Number of measurements	Timing of measurements	Value	Result	Method description
Basis weight	3,9	gsm		5			OK	peeling and weighting material
Fiber diameter	215,6	nm	±29,2	30			OK	SEM picture analysis
Adhesion	0	-	-				OK	Internal scale Elmarco 0-none 5-total
Sample volume	1	A4						
Temperature	22	°C						
Humidity	30,5	%						
SAMPLE IMAGE								
								
			Image magnificatio <div style="display: flex; align-items: center;">  <div style="margin-left: 10px;">150 x</div> <div style="margin-left: 20px;">image name: <u>xxx.150.jpg</u></div> </div> <div style="display: flex; align-items: center; margin-top: 10px;">  <div style="margin-left: 10px;">600 x</div> <div style="margin-left: 20px;">image name: <u>xxx.600.jpg</u></div> </div> <div style="display: flex; align-items: center; margin-top: 10px;">  <div style="margin-left: 10px;">5000 x</div> <div style="margin-left: 20px;">image name: <u>xxx.5000.jpg</u></div> </div>					
Notes:								

10.5 Příloha číslo 5-Membrána z PVA a naproxenu

Sample dispatch note				 ELMARCO NANO FOR LIFE				
Sample ID	DRM_110228_PVA+API_2							
Customer	UK HK	Elmarco contact (Sales)	Stránská Denisa					
Dispatch date	28.2.2011	Elmarco contact (R&D)	Klabanová Adéla					
SAMPLE DETAILS								
Polymer	(PVA+5% API 1 na suš.)		Substrate	PP spunbond modrý				
Crosslinked (Y/N)	Y							
Defects								
Measuring parameters								
Properties	Measured value	Unit	coeff. of variation	Number of measurements	Timing of measurements	Value	Result	Method description
Basis weight	2,0	gsm		5			OK	peeling and weighting material
Fiber diameter	280,2	nm	±51,3	30			OK	SEM picture analysis
Adhesion	0	-	-				OK	Internal scale Elmarco 0-none 5-total
Sample volume	1	A4						
Temperature	25	°C						
Humidity	28	%						
SAMPLE IMAGE								
								
				Image magnificatio <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="width: 20px; height: 20px; background-color: black; margin-right: 5px;"></div> <div style="width: 20px; height: 20px; background-color: white; margin-right: 5px;"></div> <div>150 x</div> <div style="margin-left: 20px;">image name: xxx.150.jpg</div> </div> <div style="display: flex; align-items: center; margin-top: 10px;"> <div style="width: 20px; height: 20px; background-color: black; margin-right: 5px;"></div> <div style="width: 20px; height: 20px; background-color: white; margin-right: 5px;"></div> <div>600 x</div> <div style="margin-left: 20px;">image name: xxx.600.jpg</div> </div> <div style="display: flex; align-items: center; margin-top: 10px;"> <div style="width: 20px; height: 20px; background-color: black; margin-right: 5px;"></div> <div style="width: 20px; height: 20px; background-color: white; margin-right: 5px;"></div> <div>5000 x</div> <div style="margin-left: 20px;">image name: xxx.5000.jpg</div> </div>				
Notes:								

10.6 Příloha číslo 6-Membrána z PVA, PEO, HPC a diosminu

Polymer	PVA + PEO + HPC + Diosmin				Substrate	PP spunbond modrý		
Crosslinked (Y/N)								
Defects								
Measuring parameters								
Properties	Measured value	Unit	coeff. of variation	Number of measurements	Timing of measurements	Value	Result	Method discription
Basis weight	3,8	gsm					OK	peeling and weighting material
Fieber diameter	382,6	nm	±39,6				OK	SEM picture analysis
Adhesion	0						OK	internal scale Elmarco 0-none 5-total
Sample volume	1	A4						
Temperature	25	°C						
Humidity	28	%						
Sample image								
 								
Image magnification								
								
 150 x Image name xxx. 150.JPG								
 600 x Image name xxx. 600.JPG								
 5000 X Image name xxx. 5000.JPG								
Notes								